



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**RABDOMİYOSARKOM HÜCRE HATTINDA
YÜKSEK DOZ STATİNLERİN NEDEN OLDUĞU
MYOPATİ ÜZERİNE CAPE'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SERKAN ŞEN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ARALIK 2022



**RABDOMİYOSARKOM HÜCRE HATTINDA YÜKSEK DOZ
STATİNLERİN NEDEN OLDUĞU MYOPATİ ÜZERİNE CAPE'İN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serkan ŞEN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serkan ŞEN
29/12/2022

RABDOMİYOSARKOM HÜCRE HATTINDA YÜKSEK DOZ STATİNLERİN NEDEN OLDUĞU MYOPATİ ÜZERİNE CAPE'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Serkan ŞEN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2022

ÖZET

Bu çalışmada atorvastatin ve rosuvastatinin ER stresi, mitokondriyal hasar, apoptoz indüksiyonu yaparak RD hücre hatlarında miyopatiye neden olduğunu gösterdik, ayrıca bu yolaklarda CAPE (kafeik asit fenetil ester) kombinasyonunun olası koruyucu etki mekanizmalarını araştırdık. Altı hücre grubu oluşturduk. Kontrol, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE ve rosuvastatin+CAPE. Apoptoz için OSI analizleri, western blot ve RT-PCR ile ATF4 ve CHOP protein analizi; AnnexinV ölçümü ve otofaji testi yapıldı. Atorvastatin oksidatif strese neden olmuş, Atorvastatin+CAPE kombinasyonu oksidatif hasar oluşturmamıştır. Atorvastatin ve rosuvastatin grubunda, kontrol grubuna nazaran apoptotik ve nekrotik hücre sayısını artmıştır. Atorvastatin+CAPE uygulanan grupta, bu sayılar kontrol grubu seviyesine düşmüştür. Rosuvastatin, ATF4 ve CHOP proteinlerini artırmış, fakat atorvastatin uygulanan grupta bu proteinlerin düzeyleri kontrol grubuyla benzerdi. CAPE kombinasyonu ile, rosuvastatinin neden olduğu ER stresi kontrol grubu seviyesine inmiştir. Rosuvastatin ve atorvastatin gruplarında otofaji düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi. CAPE uygulanan tüm gruplarda otofaji artmıştır. Sonuç olarak; atorvastatinin oksidatif stres ve ER stresi oluşturduğu, Rosuvastatinin ER stresini, apoptozu ve nekrozu arttırdığı gözlemlenmiştir. CAPE kombinasyonu atorvastatinin ve rosuvastatinin neden olduğu myopatiden hücreleri korumuştur. Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edildi. Veriler normal dağılım gösterdiği için üç ya da daha fazla grubun kıyası maksadıyla parametrik testlerden One Way ANOVA testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi için Dunnett's korelasyon analizleri yapıldı. $P<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

Bilim Kodu : 1090

Anahtar Kelimeler : Atorvastatin, Rosuvastatin, CAPE, Miyopati

Sayfa Adedi : 119

Danışman : Prof. Dr. Canan YILMAZ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CAPE ON MYOPATHY CAUSED BY HIGH
DOSE STATINS IN RHABDOMYOSARCOMA CELL LINE.

(Ph. D. Thesis)

Serkan ŞEN

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2022

ABSTRACT

[In this study, we demonstrated that atorvastatin and rosuvastatin cause myopathy in RD cell lines by causing ER stress, mitochondrial damage, induction of apoptosis, in addition, investigating possible protective effect mechanisms of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) combination in these pathways. We formed six cell group. Control, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE and rosuvastatin+CAPE. OSI analyses, ATF4 and CHOP protein analysis by western blot and RT-PCR, for apoptosis; AnnexinV measurement and autophagy assay were performed. Atorvastatin caused oxidative stress, Atorvastatin+CAPE combination did not cause oxidative damage. The number of apoptotic and necrotic cells increased in the atorvastatin and rosuvastatin group compared to the control group. In the atorvastatin+CAPE applied group, these numbers decreased to the control group level. Rosuvastatin increased ATF4 and CHOP proteins, but the levels of these proteins in the atorvastatin group were similar to the control group. With the CAPE combination, the ER stress caused by rosuvastatin was reduced to the level of the control group. Autophagy levels in the rosuvastatin and atorvastatin groups were similar to the control group. Autophagy was increased in all CAPE-treated groups. As a result; It was observed that atorvastatin caused oxidative stress and ER stress, and Rosuvastatin increased ER stress, apoptosis and necrosis. The CAPE combination protected cells from myopathy caused by atorvastatin and rosuvastatin.]

Science Code : 1090

Key Words : Atorvastatin, Rosuvastatin, CAPE, Myopathy

Page Number : 119

Supervisor : Prof. Dr. Canan YILMAZ

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması aşamalarının tamamında desteğini bir an olsun esirgemeyen tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Canan YILMAZ'a,

Doktora ders aşamasında benimle bilimsel birikimlerini paylaşan ve yol gösterici olan başta Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Neslihan BUKAN olmak üzere ana bilim dalının tüm değerli öğretim üyelerine,

Tez çalışmalarının deneysel aşamasının gerçekleştirilmesinde laboratuvarını açan ve bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e,

Flow sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesinde desteğini esirgemeyen Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e, Uzman Biyolog Keriman ÖZUĞUR ve Tekniker Serap ÇAĞLI'ya

Floresans mikroskopi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a

TDK-2021-7117 proje numarası ile tez çalışmasını destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Doktora eğitimim sürecinde zaman zaman onları yalnız bırakmak zorunda kaldığım halde buna sabır gösteren, hayattaki en büyük sığınağım olan canım aileme, oğlum Tuna ŞEN ve eşim Öğr. Gör. Dr. Merve ŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Statinler	3
2.1.1. Atorvastatin	5
2.1.2. Rosuvastatin	8
2.2. Statin ilişkili Kas Hasarı	10
2.2.1. Statin intoleransı	12
2.2.2. Statin aracılı oksidatif stres	14
2.2.3. Statin aracılı mitokondriyal hasar	16
2.2.4. Statinler ve endoplasmik retikulum stresi	16
2.2. Kafeik Asid Fenetil Ester (CAPE)	20
2.2.1. CAPE'in kas hücreleri üzerine etkisi	21
2.2.2. CAPE'in otofaji üzerine etkisi	22
2.2.3. CAPE'in ER stresi üzerine etkisi	22

	Sayfa
2.2.4. CAPE'in oksidatif stres üzerine etkisi	22
2.2.5. CAPE'in kolesterol biyosentezi üzerine etkisi.....	24
3. Otofaji	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deney Grupları.....	27
3.2. Hücre kültürü	28
3.2.1. Komple medium hazırlanışı	28
3.2.2. Hücrelerin canlandırılması	28
3.2.3. Thoma lamında hücrelerin sayılması	30
3.2.4. Hücrelerin dondurulması.....	30
3.3. Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE Doz Belirleme Çalışmaları	31
3.3.1. MTT hücre viabilite testi ve IC50 doz hesaplamaları.....	31
3.4. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	32
3.4.1. Lizis buffer malzeme listesi	32
3.4.2. Lizis buffer hazırlanışı	33
3.5. BCA Metodu ile Total Protein Ölçümü	33
3.6. Total Oksidan-Antioksidan Kapasite Analizleri	34
3.6.1. Total antioksidan kapasite (TAC) analizi:	35
3.6.2. Total oksidan kapasite (TOC) analizi:	36
3.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	37
3.8. Otofaji Assay.....	37
3.9. Total RNA İzolasyonu	38
3.9.1. Total RNA'nın saflık ve miktarının ölçülmesi	40
3.10. cDNA Sentezi.....	41

	Sayfa
3.10.1. cDNA sentez reaksiyonu.....	42
3.11. Real Time QRT-PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri.....	42
3.12. Flow Sitometri.....	43
3.13. Western Blot Analizi.....	46
3.13.1. Western blot analizi için protein izolasyonu.....	46
3.13.2. Western blot analizinde kullanılan kimyasalların hazırlanışı	47
3.13.3. Western blot analizi için protein örneklerinin denatüre edilmesi	48
3.13.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS PAGE elektroforez	48
3.13.5. Blotlama	49
3.13.6. Bloklama	51
3.13.7. Primer antikor uygulaması	51
3.13.8. Yıkama	52
3.13.9. Sekonder antikor uygulanması	52
3.13.10. İkinci yıkama.....	53
3.13.11. Görüntüleme ve bantların analizi	53
3.14. İstatistiksel Analizler.....	53
4. BULGULAR	55
4.1. Belirlenen IC ₅₀ Dozları.....	55
4.2. TAC, TOC VE OSI Bulguları.....	55
4.3. Real Time PCR Bulguları	60
4.4. Flow Sitometri Bulguları.....	63
4.5. Western Blot Analiz Bulguları.....	68
4.6. Otofaji Assay Bulguları.....	75
5. TARTIŞMA.....	79

	Sayfa
6. SONUÇ	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ.....	101

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. BSA Standartlarının Hazırlanışı	33
Çizelge 3.2. Western blotda kullanılan primer antikorlar ve sulandırma oranları.....	52
Çizelge 3.3. Western blotda kullanılan sekonder antikor ve sulandırma oranı	53
Çizelge 4.1. TOC, TAC, (OSI) düzeyleri.	56
Çizelge 4.2. TOC, TAC, OSI düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması.	57
Çizelge 4.3. Kontrol grubuna kıyasla ATF4 geni mRNA ekspresyon düzeyleri.....	60
Çizelge 4.4. Kontrol grubuna kıyasla CHOP geni mRNA ekspresyon düzeyleri	61
Çizelge 4.5. Erken apoptotik hücre yüzdelerinin gruplar arası kıyaslanması.....	64
Çizelge 4.6. Nekrotik hücre yüzdelerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması	65
Çizelge 4.7. Grupların içerdği apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri.....	65
Çizelge 4.8. Grupların western blot bulguları.....	68
Çizelge 4.9. ATF4 protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması	69
Çizelge 4.10. CHOP protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması	70
Çizelge 4.11. NDUFA9 protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması	70
Çizelge 4.12. Otofaji düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması	76

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. HMG CoAR inhibitörlerinin hücre içi kolesterol seviyesini düşürme yolları..	4
Şekil 2.2. Atorvastatinin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Atorvastatin kalsiyumun kimyasal yapısı	6
Şekil 2.4. Rosuvastatinin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2. 5. Statinlerin neden olduğu biyokimyasal değişiklikler [55].....	12
Şekil 2.6. Statinle ilişkili myopati için risk faktörleri [56].	13
Şekil 2.7. Miyotoksisiteye yol açan miyositteki statinlerin etkisinin şematik gösterimi.	15
Şekil 2.8. ER stresinin çeşitli miyopatilerdeki rolü	18
Şekil 2.9. Statin aracılı ER stresin olası biyokimyasal mekanizması.	20
Şekil 2.10. CAPE'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.11. AMPK aktivasyonu ve otofaji.	23
Şekil 3.1. G power analizine ait veriler.....	27
Şekil 3.2. Total Protein Standart Curve Grafiği (R^2 : 0,996).....	34
Şekil 3.3. Nükleik asitlerin maksimum absorbansı 260 nm dalga boyunda gerçekleşir.	40
Şekil 3.4. RNA miktarları (ng/ μ l) ve 260/280nm oranları.	41
Şekil 3.5. Pozitif kontrol grubunda Annexin V sinyali.....	45
Şekil 3.6. Flow sitometrik analizin yorumlanması	46
Şekil 4.1. Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE'in IC50 dozları.	55
Şekil 4.2. TOC, TAC ve OSI düzeylerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.3. ATF4 geni mRNA ekspresyon seviyeleri.....	62
Şekil 4.4. CHOP geni mRNA ekspresyon seviyeleri.....	63
Şekil 4.5. Flow sitometrik analizde hücrelerin yüzdesel değerlendirilmesi	66

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. % Apoptotik hücrelerin gruplar arası kıyası.....	67
Şekil 4.7. % Nekrotik hücrelerin gruplar arası kıyası.....	67
Şekil 4.8. ATF4/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.	71
Şekil 4.9. CHOP/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.	72
Şekil 4.10. NDUFA9/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.	72
Şekil 4.11. % Otofaji bulgularının normalite analizi	76
Şekil 4.12. Gruplar arası % otofaji bulguları	76

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Ponceau S Staining Solüsyonu ile görünür hale getirilen protein bantları ...	51
Resim 4.1. Beta Aktin proteinine ait western blot görüntüsü	73
Resim 4.2. ATF4 proteinine ait western blot görüntüsü	73
Resim 4.3. CHOP proteinine ait western blot görüntüsü	74
Resim 4.4. NDUFA9 proteinine ait western blot görüntüsü	74
Resim 4.5. Floresans mikroskoptan alınan otofaji görüntüleri	75

|

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

cm²

Santimetrekare

ml

Mililitre

μM

Mikromolar

mg

Miligram

g

Gram

Kısaltmalar

Açıklamalar

7-AAD

7- Amino-Aktinomisin D

ABTS

2,2'-Azinobis-(3- Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit)

AKT

Proteinkinaz B

AMPK

Aktive Protein Kinaz

ATF4

Activating Transcription Factor 4

BCA

Bisinkoninik Asit

Bcl-2

B Hücreli Lenfoma2

BSA

Bovine Serum Albumin

cAMKK

Ca²⁺/Kalmodulin Bağımlı Kinaz Kinaz

CAPE

Kafeik Asit Fenetil Ester

CAT

Katalaz

CHOP

C/EBP Homologous Protein

CK

Kreatinin Kinaz

Clc-1

Klorür Kanalı

Coq10

Ubikinon

Cytc

Sitokrom C

DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO

Dimetilsülfoksit

EAS

Avrupa Ateroskleroz Derneği

ECL	Gelişmiş Kemilüminesans
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ER	Endoplasmik Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
Foxo3	Forkhead Box O3
Gcl	İstirahat Klorür Kanalı İletkenliği
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfat
GLUT4	Glikoz Transporter 4
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Glutasyon
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-CoA	Hidroksimetilglutaril-CoA
HMG-CoAR	3-Hidroksi-3-Metilglutaril-Koenzim A Redüktaz
IMNM	İmmün Aracılı Nekrotizan Miyopati
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MCT	Monokarboksilat Taşıyıcı
MDA	Malondialdehit
MHC-1	Büyük Doku Uyuşum Kompleksi
mPTP	Mitokondriyal Geçirgenlik Geçiş Poru
mTOR	Rapamisinin Memeli Hedefi
MuRF-1	Kas HALKA-Parmak Proteini-1
NDUFA9	NADH Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A9
NFDM	Yağsız Kuru Süt Tozu
NO	Nitrik Oksid
OD	Optik Dansite
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PBST	Fosfat Tamponlu Tuz, %0,1 Tween 20
PDK	Piruvat Dehidrojenaz Kinazlar
PI	Propidium İodat
PI3K	Fosfoinositid 3-Kinaz
PS	Fosfatidilserin

RD	Rabdomiyosarkom
RhoA	Ras Homolog Gen Ailesi Üyesi
RKÇ	Randomize Kontrollü Çalışmalarda
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Dakikada Dönüş Sayısı
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SIRT1	Silent Information Regulator 1
SOD	Süperoksid Dismutaz
SREBP	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Proteinler
TAC	Total Antioksidan Kapasite
TOC	Total Oksidan Kapasite
UIPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1. GİRİŞ

Sterol biyosentez yolağındaki kilit adımlardan biri olan Hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz enziminin inhibitörleri olan statinler, güçlü kolesterol düşürücü ilaçlardır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine olağanüstü katkılar sağlamışlardır [1]. Statinlerin keşfinden bu yana kardiyovasküler hastalıklarda gözle görülür fayda sağlaması nedeniyle toplumlarda kullanım sıklığı artmıştır. Örneğin Avrupa Ateroskleroz Derneği (EAS)'nin verilerine göre; 40 yaşından büyük Danimarkalı bireylerin statin kullanımı 1995'de %1 iken 2010 yılına gelindiğinde %11'e yükselmiştir. Statinlerin kullanım sıklığına paralel olacak şekilde statin kullanımının terk edilme oranı ise 1995'de %2 iken 2010'a gelindiğinde %13'e yükselmiştir. EAS'ye göre statin reçetelenmesinin tek reçete ile sınırlı kalmasının birçok nedeni olmakla beraber yaygın nedenlerden bir tanesi olarak statin ilişkili kas semptomları gösterilmektedir [2-4].

Propolisin önemli bir fenolik aktif bileşeni olan kafeik asit fenetil ester (CAPE), antimikrobiyal, antitümör, antioksidan, antiinflamatuvar ve benzeri gibi geniş bir farmakolojik aktiviteye sahiptir [5]. ROS'u temizleme ve immünomodülatör yetenekleri nedeniyle, CAPE'nin kardiyomiyosit apoptozunun zayıflaması ve miyokardiyal enfarktüs boyutunun azaltılması dâhil olmak üzere hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kalp kası koruyucu etkinlikte olduğu bildirilmiştir [6,7].

Çalışmamız kapsamında statinlerin kas hasarına neden olabileceği potansiyel mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmış olup; statinlerin kas hücrelerinde Endoplasmik Retikulum (ER) Stresine, oksidatif strese, mitokondriyal hasara, apoptoza ve otofajiye neden olup olmadığı ve kardiyomiyosit koruyucu etkinlikte olan CAPE'nin kas hücrelerindeki statin hasarına olası olumlu etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Statinler

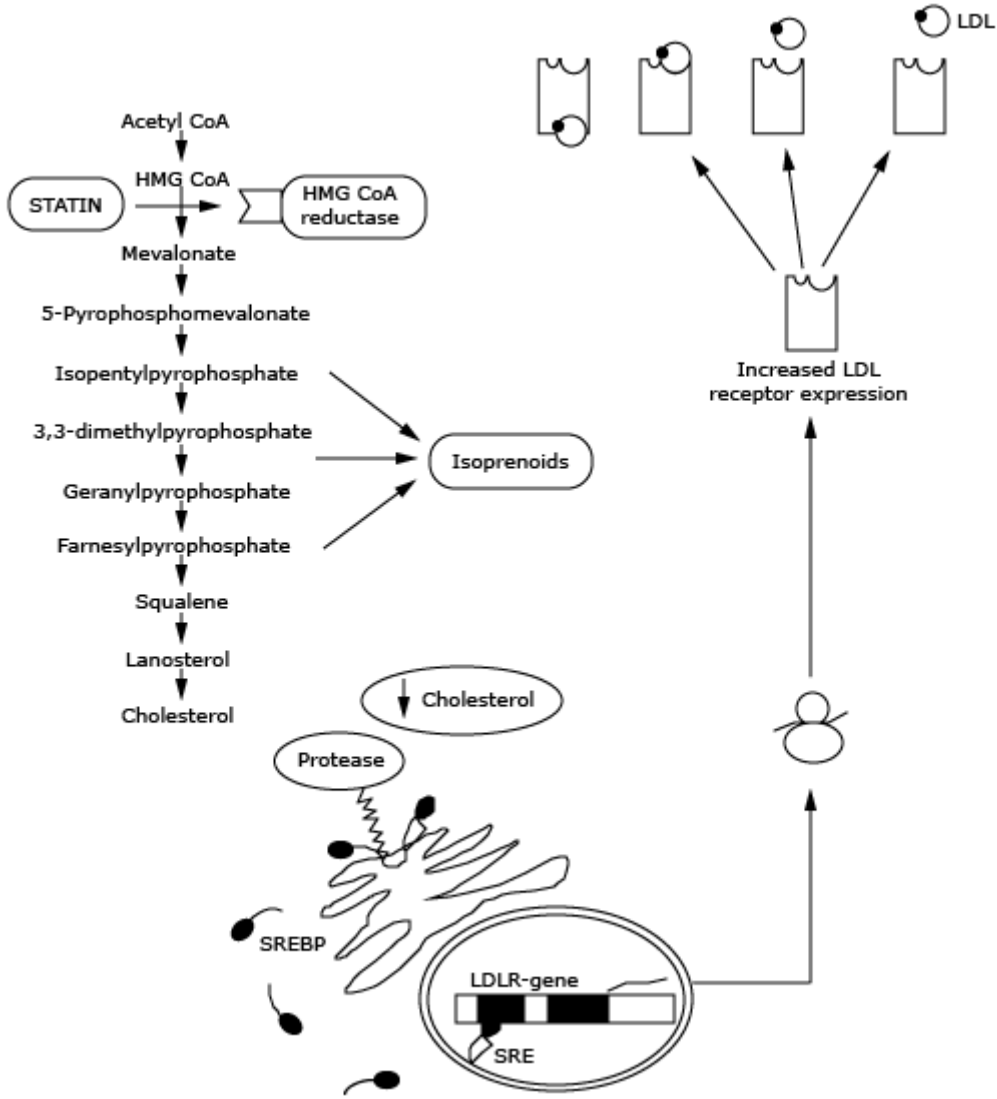
Sterol biyosentez yolağındaki kilit adımlardan biri olan Hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz enziminin inhibitörleri olan statinler, mantar kökenli moleküllerdir. Statinler, güçlü kolesterol düşürücü ilaçlardır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine olağanüstü katkılar sağlamıştır [1].

1994 yılında, hiperkolesterolemili orta yaşlı erkeklerde miyokard enfarktüsü sonrası mortaliteyi azaltmak için lipid düşürücü ilaçlar olarak statinler piyasaya sürülmüştür. Daha sonra, statin reçeteleme önerileri, farklı kategorilerde aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar (KVH), diyabet ve ayrıca KVH gelişme riski yüksek olarak değerlendirilen bireyleri kapsayacak şekilde kademeli olarak genişlemiştir [8].

Statinler günümüzde dislipidemiye bağlı kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için en etkili oral ajanlar olarak bilinmektedir. Lovastatin ve simvastatin inaktif lakton formunda ve pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, pitavastatin ve rosuvastatin aktif β -hidroksi asit formunda uygulanmaktadır. Statinlerin farmakolojik tepkisi, HMG-CoA redüktazı inhibe edecekleri hepatosite ulaşma yeteneklerine bağlıdır [9]. HMG-CoA redüktazın inhibisyonu sadece kolesterol sentezini değil, aynı zamanda ubikinon, steroidler, safra asitleri, D vitamini ve ayrıca geranilgeranil pirofosfat (GGPP) ve farnesil pirofosfat sentezini de azaltmaktadır [10].

Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler (SREBP) birer transkripsiyon faktörüdürler ve DNA dizisinde sterol bağlama elemanı olarak bilinen bölgeye bağlanırlar [11]. HMG CoA Redüktaz inhibisyonu hücre içi kolesterol seviyelerini düşürür; bu durum SREBP'leri endoplazmik retikulumdan ayıran bir proteazı aktive eder ve böylelikle SREBP'ler, Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) reseptör geninin ekspresyonunu up regüle ettikleri çekirdeğe yer değiştirirler. Gelişmiş LDL reseptör ekspresyonu, LDL'nin reseptör aracılı endositozunu artırır ve böylece serum LDL'sini düşürür. HMG-CoA redüktazın

inhibisyonu ayrıca kolesterol biyosentezinde ara ürünler olan izoprenoidlerin hücre içi seviyelerini de azaltır (Şekil 2.1) [12].



Şekil 2.1. HMG CoAR inhibitörlerinin hücre içi kolesterol seviyesini düşürme yolları [12].

Statinlerin çoğu, az miktarda da olsa yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol yükseltme özelliklerine sahiptir, ancak rosuvastatin HDL yükseltici özelliği bakımında diğer statinlerden pozitif ayrışır. Kullanılan statine ve dozuna bağlı olarak trigliserid konsantrasyonları statin kullanmayanlara nazaran statin kullananlarda ortalama yüzde 20 ila 40 düştüğü bilimsel yayınlarda rapor edilmektedir. Ülkemizde statin kullanımı üzerine

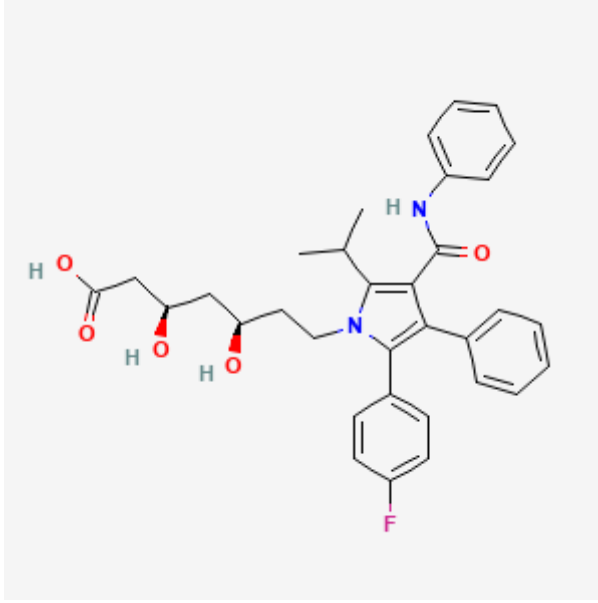
yapılan bir çalışmada; 1 Ocak 2008 ve 31 Aralık 2017 tarihleri arasında LDL kolesterol değerlerini içeren tüm çalışmalar taranmış ve ülkemizde statin kullanımı neticesinde ortalama LDL-kolesterol düzeyinde %34,9; trigliserit düzeyinde ise %17,1 azalmanın olduğu rapor edilmiştir [13].

Literatür verilerinde statin kullanan bireylerde klinik olarak ortaya çıkan hastalıkların raporları arasında myastenia gravis [14,15], mitokondriyal miyopati [16-18], McArdle hastalığı [18-20], asit maltaz eksikliği [21], kas fosforilaz b kinaz eksikliği [22], karnitin-palmitoil transferaz eksikliği [23], dalgalanan kas hastalığı (rippling muscle disease) [24], miyotonik distrofi tip 1 ve 2 [18, 25], motor nöronopatiler (örneğin, Kennedy hastalığı) [18] ve ALS [26], dermatomiyozit / polimiyozit, inklüzyon cisimcikli miyozit, karnitin palmitoyltransferaz II eksikliği ve miyoadenilat deaminaz eksikliği [27] bulunmaktadır.

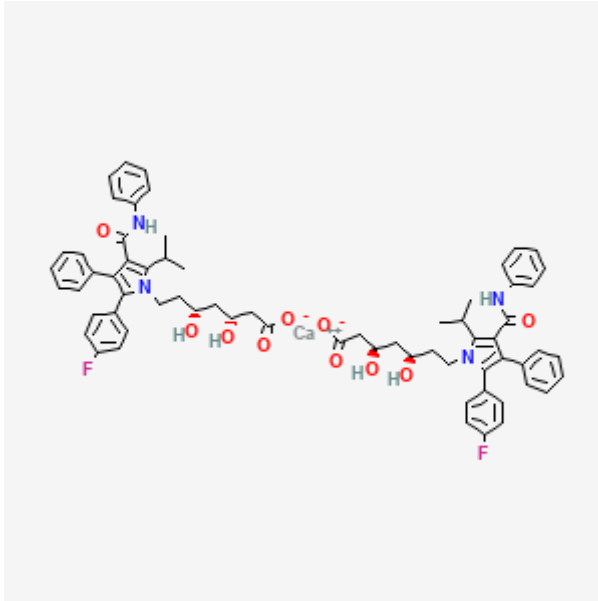
2.1.1. Atorvastatin

Atorvastatin, dünyada en yaygın olarak reçete edilen ilaçlardan ve statinlerden biridir. Olumsuz kardiyovasküler olayları önlemek ve total kolesterol ve LDL-kolesterolünü düşürmek için reçete edilen bir HMG-CoA redüktaz inhibitörüdür [28].

Kapalı formülü $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ olan atorvastatinin Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (UIPAC) adlandırması (3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-propan-2-ylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid şeklindedir ve 558.6 g/mol moleküler ağırlığına sahiptir (Şekil 2.2). Ancak ticari satış formları Atorvastatin Kalsiyum şeklinde olup tez çalışmasında da bu form kullanılmıştır. Kapalı formülü $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$ olan Atorvastatin Kalsiyumun UIPAC adlandırması calcium;(3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-propan-2-ylpyrrol-1-yl]-3,5 dihydroxyheptanoate şeklinde olup moleküler ağırlığı 1155.3 g/mol'dür (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Atorvastatinin kimyasal yapısı



Şekil 2.3. Atorvastatin kalsiyumun kimyasal yapısı

Yüksek yoğunluklu atorvastatin tedavisi (40 ila 80 mg/gün) genellikle LDL Kolesterolü % ≥ 50 oranında azaltırken orta yoğunluklu atorvastatin tedavisi (10 ila 20 mg / gün) genellikle LDL Kolesterolü yaklaşık % 30 ila % 49 oranında azaltmaktadır. Tedavinin

başlatılmasından veya doz ayarlamasından yaklaşık 1 ila 3 ay sonra ve bundan sonra her 3 ila 12 ayda bir atorvastatine yanıtın tekrar değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir [29,30].

Hem heterozigot hem de homozigot ailesel hiperkolesterolemili hastalarda çoklu lipid düşürücü tedavi uygulamasında atorvastatin tercih edilmesi durumunda yüksek yoğunluklu (80 mg/gün) tedavinin uygulanması tavsiye edilmiştir [29, 31, 32].

Atorvastatin hızla emilir ve 2-3 saat içinde doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Atorvastatinin lipid düşürücü etkisi, 20 saatlik nispeten uzun yarılanma ömrü nedeniyle, ilacın uygulandığı günün saatinden etkilenmez. Atorvastatin, sitokrom P-450 3A4 ve P-450 3A5 tarafından orto-hidroksi atorvastatin ve para-hidroksi atorvastatine metabolize edilir. Bu iki aktif metabolit, atorvastatinin HMG-CoA redüktaz üzerindeki etkisini uzatarak enzim inhibisyonunun yarılanma ömrünün 20 ila 30 saat olmasını sağlar [33-35]. Atorvastatin ve bir sınıf olarak statinlerin, tıkalı vasküler hastalığı olan kişilerde mortaliteyi ve majör vasküler olayları azalttığı bireysel randomize kontrollü çalışmalarda (RKÇ'ler), sistematik incelemelerde ve RKÇ'lerin meta-analizlerinde gösterilmiştir [28].

Atorvastatin, kolesterol sentezi için hız sınırlayıcı enzim olan HMG-CoA redüktazı karaciğerde inhibe ederek etki eder. Bu enzim, HMG-CoA'yı geri dönüşümsüz olarak mevalonata dönüştürmektedir [36]. Bu reaksiyon; total kolesterol, LDL kolesterol ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) kolesterol dâhil olmak üzere birçok bileşiğin üretilmesiyle sonuçlanan bir reaksiyon dizisindeki üçüncü adımdır [37]. Hâkim hipotez, statinlerin, tıkalı vasküler hastalığı olan hastalarda, karaciğer kolesterol üretimini azaltarak ve böylece kan LDL-kolesterolünde bir azalmaya ve bunun sonucunda da ateroskleroza azalmaya neden olarak mortalite ve morbiditeyi azalttığıdır. Bununla birlikte, HMG Co-A redüktaz enzimi aynı zamanda ubiquinone (ko-enzim Q10), heme a, vitamin D, steroid hormonları ve diğer birçok bileşiğin üretiminden de sorumludur. Statinlerin yararlı etkilerinin, kolesterolün düşürülmesi dışındaki eylemlerden kaynaklanması da olasıdır. Bu diğer eylemler, statinlerin pleiotropik etkileri olarak adlandırılmaktadır[38].

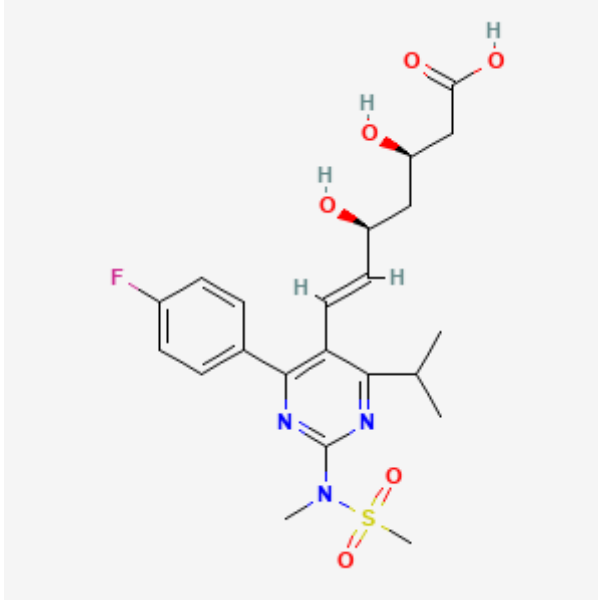
Statin tedavisinin kas fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemek için 2013 yılında tasarlanan 420 sağlıklı yetişkinde yapılan 6 aylık randomize bir çalışmada, atorvastatinin

80 mg/gün ile tedavi edilen hastalarda plaseboya göre daha yüksek bir miyalji insidansına neden olduğunu (yüzde 9.3'e karşı yüzde 4.6) gösterilmiştir [39].

2021 yılında sunulan bir olgu çalışmasında; 84 yaşında bir kadında atorvastatin ile tedavi sırasında rabdomiyoliz gelişmiştir. Hipertansif (Barthel skoru 100; Lawton skoru 8) olan kadın, iki damarında lezyon bulunan ST elevasyonsuz akut koroner sendrom nedeniyle hastaneye yatırılmış ve perkütan koroner girişimle iki stent implantasyonu yapılmıştır. Taburcu edildikten sonra klopidoğrel, aspirin (asetilsalisilik asit), pantoprazol, ramipril, bisoprolol, zolpidem ve atorvastatin 80mg tedavisi almıştır. Ancak 25. günde sağ kalça kemiğinde, aynı taraftaki bacağı yayılan ağrı nedeniyle tekrar başvuruda bulunmuştur. Kas içi betametazon, gabapentin ve oksikodon tedavisine rağmen semptomları kötüleşmiş, bu da yürümesini imkânsız hale getirmiş ve ayakta durması çok acı verici olmuştur. Başvuru sırasında, kan testleri kreatinin 1,32 mg/dL, AST 991 IU/L, ALT 477 IU/L ve CK 28,290 IU/L olarak ortaya çıkmış ve bu durum rabdomiyolizi düşündürmüştür. Bu nedenle atorvastatin kesilerek sıvı tedavisi ve analjezi başlanmıştır. 48 saat sonra kadının durumu hemodinamik dengesizlik ve şiddetli karın ağrısı ile kötüleşmiştir. Karın BT taramasında özellik bulunamamıştır. SLCO1B1 için ara aktiviteye sahip genetik polimorfizm daha sonra doğrulanmıştır ve rabdomiyoliz ile atorvastatin arasındaki potansiyel bağlantı, Naranjo'nun algoritması ile değerlendirildiğinde ilk yan etki reaksiyonunun kesin reaksiyon olduğu doğrulanmıştır [40].

2.1.2. Rosuvastatin

Kapalı formülü $C_{22}H_{28}FN_3O_6S$ olan Rosuvastatinin UIPAC adlandırması (E,3R,5S)-7-[4-(4-fluorophenyl)-2-[methyl(methylsulfonyl)amino]-6-propan-2-ylpyrimidin-5-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid şeklinde olup 481.5 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Rosuvastatinin kimyasal yapısı

Yüksek yoğunluklu rosuvastatin tedavisi (20 ila 40 mg/gün) genellikle LDL Kolesterolü ≥ 50 oranında azaltmakta iken orta yoğunluklu rosuvastatin tedavisi (5 ila 10 mg/gün) genellikle LDL Kolesterolü yaklaşık % 30 ila % 49 oranında azaltmaktadır. Tedavinin veya doz ayarlamasının başlamasından yaklaşık 1 ila 3 ay sonra ve bundan sonra her 3 ila 12 ayda bir yanıtın değerlendirilmesi literatür verilerince tavsiye edilmektedir [29].

Özellikle heterozigot ailesel hiperkolesterolemili ve homozigot ailesel hiperkolesterolemili hastalarda [41] ve şiddetli hiperkolesterolemili hastalarda [42] çoklu lipid düşürücü tedaviye ihtiyaç bulunmaktadır ve böyle durumlarda rosuvastatinin 40 mg/gün olacak şekilde yüksek yoğunluklu uygulanması literatür verilerinde tavsiye edilmiştir. Bu bakımdan rosuvastatinin yüksek dozda kullanımı bu gibi özel durumlarda kaçınılmazdır.

Rosuvastatinin 17.802 yetişkinde yapılan bir çalışmada 20 mg/gün dozda kas toksisitesi oranları plaseboya benzer bulunmuştur [43]. Bununla birlikte, özellikle ABD Gıda ve İlaç İdaresi önerdiği dozlardan daha yüksek tedavi edilen miyopatiye eğilimli hastalarda, rosuvastatin ile rabdomiyoliz raporları mevcuttur. Bu bağlamda rosuvastatin için özellikle 40 mg/gün'lük en yüksek doz için myopati riski vurgulamaktadır.

2.2. Statin İlişkili Kas Hasarı

Statine bağlı miyalji ve miyopati tipik olarak proksimal, simetrik kas güçsüzlüğü ve/veya ağrı olarak ortaya çıkmaktadır [44]. Kas hassasiyeti olabilmekte ve kolları başın üzerine kaldırmada zorluk, oturma pozisyonundan kaynaklanan veya merdiven çıkma gibi fonksiyonel bozukluklar gözlemlenebilmektedir. Bu belirtiler çoğu zaman hasta tarafından yorgunluk veya bitkinlik olarak tanımlanmaktadır. Bildirilen diğer semptomlar arasında gece krampları dâhil kramp, sertlik [45,46] ve tendon ağrısı da [44] bulunmaktadır.

Kas bulgularının ilk ortaya çıkışı çoğunlukla statin tedavisinin başlamasından sonraki haftalar ya da aylar içinde gözlemlenmektedir. Wisconsin Üniversitesi Hastanesi'nde statin tedavisi almış 437 hastanın hastane kayıtlarından retrospektif olarak yapılan bir çalışmada bu hastaların 45'inde statinle ilişkili miyopati vakasına rastlandığı rapor edilmiştir. Kaslarla ilgili semptomlar ortaya çıkmadan önce hastalar ortalama 6,3 ay statin tedavisi görmüşler ve bu hastaların yaklaşık üçte ikisinde tedaviye başladıktan sonraki altı ay içinde semptomlar ortaya çıkmıştır. Bu hasta grubundan 6 hasta rabdomiyoliz tedavisi için hastaneye yatırılmış bunlardan 2'sinde geri dönüşümlü böbrek fonksiyon bozukluğu ortaya çıkarken önceden böbrek yetmezliği yaşamış olan 1 hasta ise yaşam boyu diyalize başlamıştır [47].

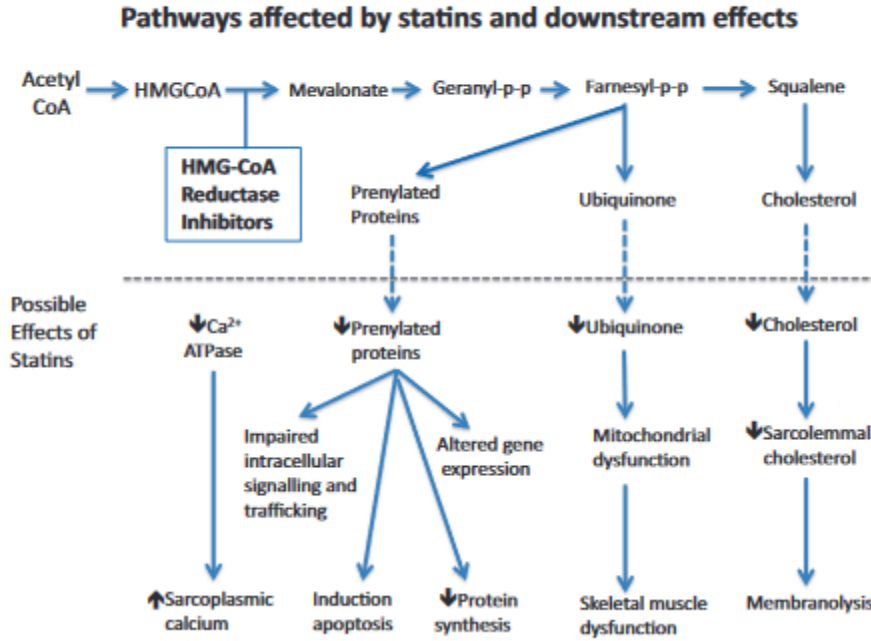
Statin tedavisi nöromusküler bazı bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında polimiyozit, dermatomiyozit, inklüzyon cisimcikli miyozit gibi enflamatuar miyopatilerin yanı sıra immün aracılı nekrotizan miyopati de (IMNM) [48-53] bulunmaktadır.

Bir çalışmada statin tedavisi sırasında veya sonrasında kas güçsüzlüğü/miyaljileri ve kreatin kinaz (CK) yükselmeleri gösteren ve statinin kesilmesine rağmen belirti ve semptomların devam ettiği 26 hasta bildirilmiş ve tüm hastaların immünosupresif tedavi ile tedavi edildikleri rapor edilmiştir [54]. Bu bakımdan statin ile ilişkili IMNM ve inflammatuar miyopati, kategorik antitelerden ziyade patofizyolojik bir spektrumu temsil ettiği söylenebilir. Bu örnekten de anlaşılacağı üzere IMNM nadir olmasına rağmen, statin tedavisi kesildikten sonra kasla ilgili semptomların birkaç hafta içerisinde düzelmemesi

sonrası klinisyen tarafından hastanın bir kas uzmanına IMNM açısından danışılması gözden kaçırılmamalıdır.

EAS'nin raporlarına göre; statin ile ilişkili kas semptomları, statin kesilmesinin başlıca nedenlerinden biridir ve olumsuz kardiyovasküler sonuçlara katkıda bulunmaktadır. Statin ile ilişkili kas semptomları, kayıtlarda ve gözlemsel çalışmalarda % 7 - 29'luk bir prevalansla, genellikle normal veya minimal düzeyde yüksek CK seviyelerine sahip daha geniş bir klinik yelpazeyi kapsamaktadır [2].

Needham ve Mastaglia'a göre HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan statinler kolesterol sentezini inhibe etmenin yanında geranil pirofosfat ve farnesil pirofosfatı da inhibe ederek hücre içerisinde birçok biyokimyasal sürecin etkilenmesine neden olmaktadır. Örneğin prenil proteinlerin hücre içi derişiminin azalması neticesinde alternatif bazı genlerin eksprese olduğu, apoptozun uyarıldığı, hücre içi protein sentezinin düştüğü ve hücre içi biyokimyasal haberleşmenin bozulduğu öne sürülmüştür. Ayrıca ubikinon sentezindeki düşüşe bağlı olarak mitokondriyal disfonksiyonların gelişmesi ile iskelet kası hasarlanmalarına dikkat çekilip hücre içi kolesterol miktarındaki dramatik düşüklüklerin sarkolemmal kolesterol içeriğinin düşmesine bunun da membranlizise neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.5)[55].

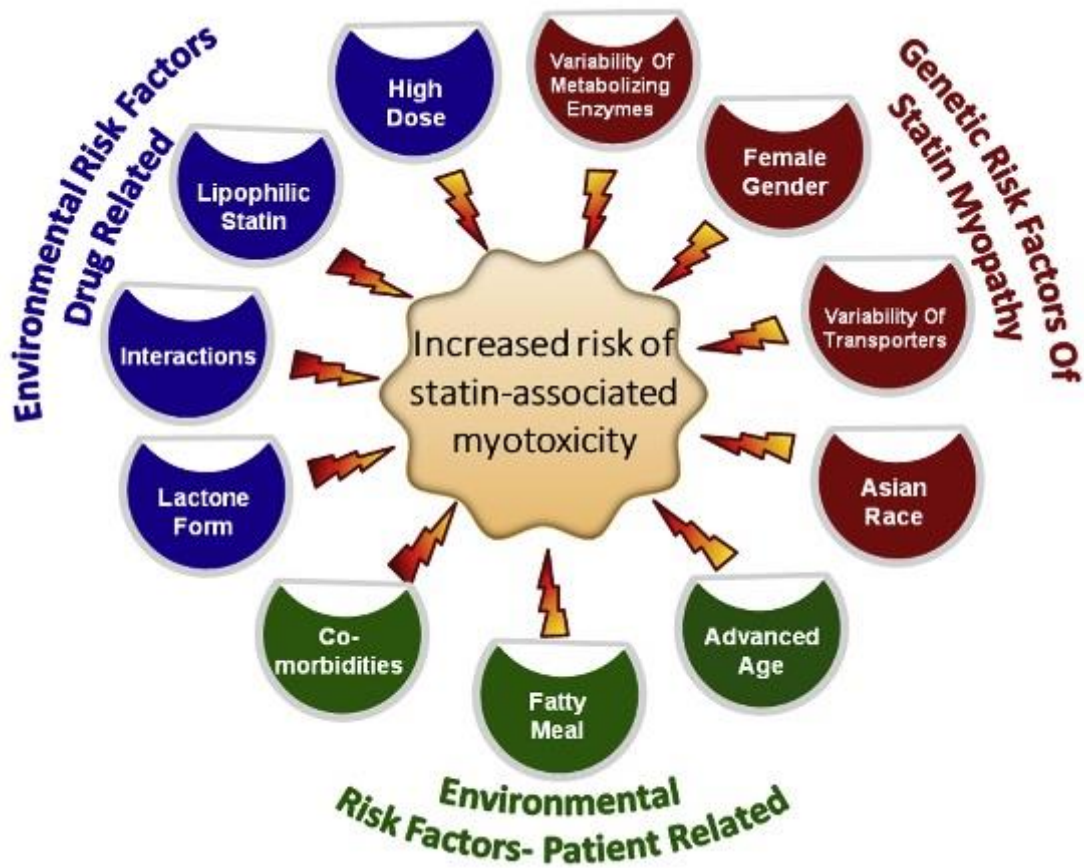


Şekil 2. 5. Statinlerin neden olduğu biyokimyasal değişiklikler [55].

2.2.1. Statin intoleransı

Statin ilişkili miyopati, özellikle yüksek doz statin terapilerinde ortaya çıkmaktadır ve bu nedenle, daha agresif lipid düşürücü tedavilere ihtiyaç duyan yüksek kardiyovasküler riskli hastalarda veya diğer ilaçlarla metabolik etkileşimler nedeniyle komorbiditesi olan hastalarda statin ilişkili miyopati insidansı daha yüksek olmaktadır [56, 57].

Statin kullanımı nedeniyle miyotoksisite gelişme olasılığı, belirli risk faktörlerinin varlığında daha yüksek görünmektedir. Bu tür risk faktörleri, genel olarak çevresel ve genetik risk faktörleri olarak sınıflandırılabilir. Çevresel risk faktörlerinin çoğu (ilaçla ve hastayla ilişkili çevresel risk faktörleri şeklinde alt gruplara ayrılabilir) değiştirilebilir olmasına rağmen, genetik faktörler kaçınılmaz olarak statin miyotoksisitesine yatkınlık yaratmaktadır. Şekil 2,6’da statinle ilişkili risk faktörleri özet olarak sunulmuştur [56].



Şekil 2.6. Statinle ilişkili myopati için risk faktörleri [56].

Ulusal Lipid Derneği'nin Kas Güvenliği Uzman Paneli, statin ile ilişkili kas hasarını incelemek ve miyaljiyi değerlendirmek için klinik bir indeksin geliştirilmesi ve kas hasarını araştırmak için tanısal nöromüsküler çalışmaların kullanımı ile olumsuz kas olayları sonucu statinlere karşı toleranssız olabilecek hastaların değerlendirilmesi ve tedavisi için bir algoritma geliştirmişlerdir [58]. Bu algoritmaya göre;

Miyalji: Normal CK seviyesine sahip, egzersizle birlikte veya egzersizden hemen sonra kas ağrıları, ağrı, sertlik, hassasiyet veya kramplar dâhil olmak üzere kas rahatsızlığının bir belirtisini bulundurmak. Miyalji semptomları, grip gibi viral bir sendromla yaşananlara benzer şekilde tanımlanabilir.

Miyopati: CK seviyesinde bir yükselme olsun veya olmasın ağrıya bağlı olmayan kas zayıflığı

Miyozit: Kas iltihabı.

Miyonekroz: Kas enzimlerinde aşağıdaki şekilde yükselme CK seviyelerinin yaş, ırk ve cinsiyet için ayarlanmış normalin üst sınırı ile karşılaştırıldığında:

Hafif CK yükselmesi; 3 ila 10 kat yükseklik

Orta CK yükselmesi; 10 ila 50 kat yükseklik

Şiddetli CK yükselmesi; 50 kat veya daha yüksek yükseklik

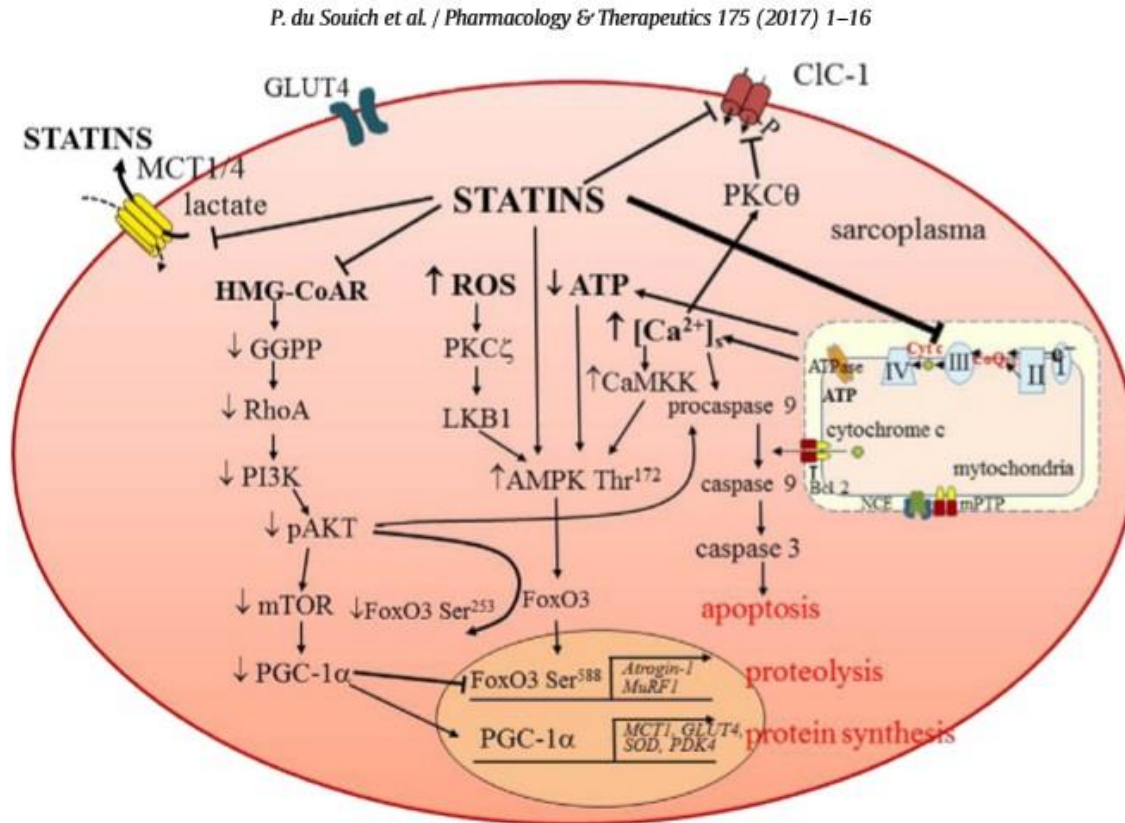
Klinik rabdomiyoliz: Miyogloblinüri veya akut böbrek yetmezliği ile miyonekroz olarak tanımlanır (serum kreatinininde en az 0,5 mg/dL [44 mikromol/L] artış).

Statin reçete edilen hastalar ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle tedaviyi bırakmaktadır [59]. 10.138 katılımcı ile yapılan bir anket araştırmasında statin tedavisinin yarıda bırakılmasının primer nedeninin yan etkiler olduğunu ortaya koymuştur [60]. Bu çalışmada 10.138 katılımcının 8918'i (%88) mevcut statin kullanıcısı ve 1220'si (%12) eski kullanıcıydı. Katılımcılar (ortalama yaş 61) ağırlıklı olarak beyaz (%92), kadın (%61), orta gelirli (ortalama 44.504 \$/yıl) ve sağlık sigortasına (%93) sahipti. Mevcut kullanıcıların %95'i sadece statin almış ve %70'i son ay hiç bir dozu kaçırmış ve eski ve mevcut kullanıcıların sırasıyla %60 ve %25'i tarafından kas ile ilgili yan etkilerden muzdarip olduğu ifade edilmiştir.

2.2.2. Statin aracılı oksidatif stres

Sarkoplazmada statinler HMG-CoA redüktazı inhibe etmekte ve bu yolla GGPP azaltılmaktadır. RhoA prenilasyonunu ve aktivasyonunu azaltacak etki ve AKT (proteinkinaz B) fosforilasyonunu, FoxO3'ün nükleer translokasyonunu ve ayrıca atrogin-1 ve MuRF1'in proteoliz ile ekspresyonunu desteklemektedir. Mitokondride ise statinler

kompleks I ve III'e bağlanarak, azalmış ATP üretimi, ROS artışı ve sitokrom c ve Ca^{+2} sızıntısı ile mitokondriyal solunum zincirini bozmakta, bu fenomen AMPK'yi, FoxO3'ün nükleer translokasyonunu aktive ederek proteoliz ve apoptoza katkıda bulunmaktadır. AKT'nin azaltılmış aktivasyonu ayrıca SOD, CAT, GPx, MCT1 / 4 ve GLUT4'ün azalmış ekspresyonuna ve FoxO3Ser588'in DNA hedeflerine bağlanmasına yol açan PGC-1 α translokasyonunu da azaltmaktadır. Öte yandan, MCT4 ve CIC-1 kanalının inhibisyonu ile statinler gCl'yi azaltarak sarkoplazmik laktat konsantrasyonlarını ve kas uyarılabilirliğini artırmaktadır. Düşük ATP ve gCl ile artmış sarkoplazmik Ca^{+2} , ROS ve laktat yorgunluğa, kramplara ve kas ağrısına neden olmakta ve sarkomaya zarar vererek artan proteoliz, apoptoz ve ROS CK'nin kan konsantrasyonlarında artışa neden olmaktadır (Şekil 2.7) [10].



Şekil 2.7. Miyotoksisiteye yol açan miyositteki statinlerin etkisinin şematik gösterimi.
(AKT: proteinkinaseB; AMPKAMP: activated protein kinase; Bcl-2B cell lymphoma2;
CaMKKCa2+/Calmodulin-dependent Kinase Kinase; CK: creatine kinase; CIC-1:
chloride channel; CoQ10: ubiquinone; Cytc: cytochrome c; FoxO3: forkhead box O3;
gCl: resting chloride channel conductance; GGPP: geranyl geranyl pyrophosphate;

GLUT4: glucosetransporter 4; HMG-CoAR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; MAFbx or atrogin-1: muscle atrophy F-box; MCT: monocarboxylate transporter; mPTP: mitochondrial permeability transition pore; mTOR: mammalian target of rapamycin; MuRF-1: muscle RING-finger protein-1; PDK: piruvate dehydrogenase kinases; PGC: transcription factors peroxisome-proliferator-activated receptor coactivator; RhoA: Ras homolog gene family member A; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase) [10].

2.2.3. Statin aracılı mitokondriyal hasar

İskelet kasındaki ubikinonun azalmasının statine bağlı kas hasarına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalar statinlerin iskelet kası ve plazma ubikinon konsantrasyonlarını azalttığını bulmuştur [61-64].

Statin ile ilişkili miyopati ve normal CK seviyeleri olan dört hastadan alınan kas biyopsilerinde artmış intramüsküler lipid içeriği, azalmış sitokrom oksidaz boyama ve düzensiz kırmızı lifler dâhil olmak üzere anormal mitokondriyal fonksiyonla tutarlı bulgular gösterilmiştir [65].

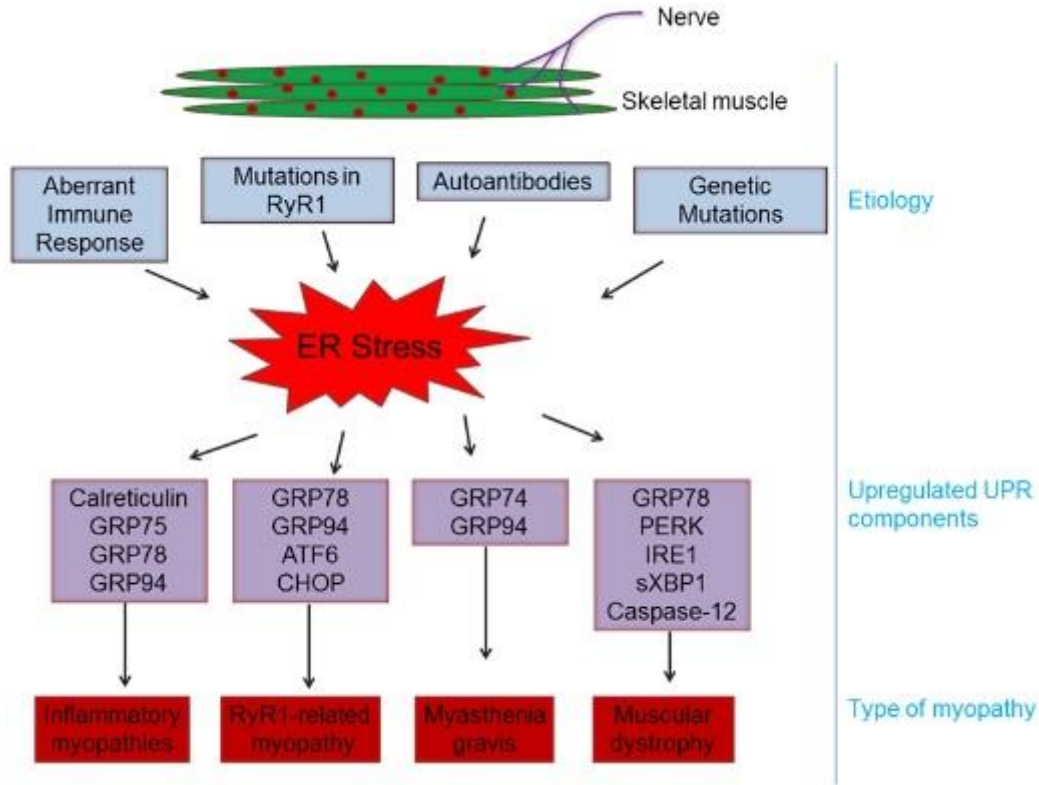
Yapılan bir çalışmada 8 hafta süreyle simvastatin 80 mg/gün ile tedavi edilen hastalardan alınan iskelet kası biyopsilerinde azalmış mitokondriyal DNA (mtDNA) seviyeleri bulunmuştur [66]. Stringer ve arkadaşları ise simvastatin uygulanan hastalarda kas ubikinonundaki değişiklikler ile mtDNA / nükleer DNA oranlarındaki değişiklik arasında pozitif bir genel korelasyonun varlığını gösterip aslında mitokondriyal hasarın ubikinon düşüklüğü ile alakalı olabileceğini ileri sürmüştür [67].

2.2.4. Statinler ve endoplasmik retikulum stresi

ER ökaryotik hücrelerde salgı proteinlerinin sentez ve salgılanma yolağındaki ana organeldir. ER'deki katlanmalardan sorumlu proteinler, foldazlar (katlanmayı katalizleyen

enzimler ve moleküller) ve şaperonlar (agregasyonu önleyerek protein katlanmasına yardımcı olan proteinler) olmak üzere iki sınıfta toplanmaktadır. Bazı koşullarda bu işlem mekanizması bozulabilmektedir. Örneğin oksijen, glukoz, pH, ATP ve kalsiyum iyon konsantrasyonlarındaki değişiklikler yanlış katlanmış veya hiç katlanamamış proteinlerin üretilmesine neden olmaktadır. Bu proteinler de hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını bozmakta; bu işlem “proteotoksisite” ya da “ER stresi” olarak adlandırılmaktadır. ER stresi çeşitli koşullarda protein glikolizasyonunun bozulması, disülfid bağların oluşumunda azalma, ER lümeninde Ca^{+2} azalması, ER’den Golgi’ye protein transportunun bozulması gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Hücreler, ER stresine karşı hücrel bir korunma mekanizmasına sahiptir ve dört farklı cevap yolağı ile hücre ER stresinden korunmaya (ER stresine cevap) çalışmaktadır [68,69].

Miyopati, özellikle proksimal kaslarda değişen derecelerde güçsüzlük ve işlev bozukluğuna yol açan miyofiberin yapısının ve metabolizmasının bozulduğu sistemik bir klinik hastalığı ifade eder. Genetik mutasyonlar, ilaçlar, toksinler, iltihaplanma, enfeksiyon ve endokrin ve elektrolit dengesizlikleri dahil olmak üzere bir dizi faktör miyopatiye neden olabilir. Ortaya çıkan kanıtlar, ER stresinin ve UPR (katlanmamış protein cevabı) 'nin çeşitli miyopati tiplerinde de aktive olduğunu göstermektedir (Şekil 2.8) [70].



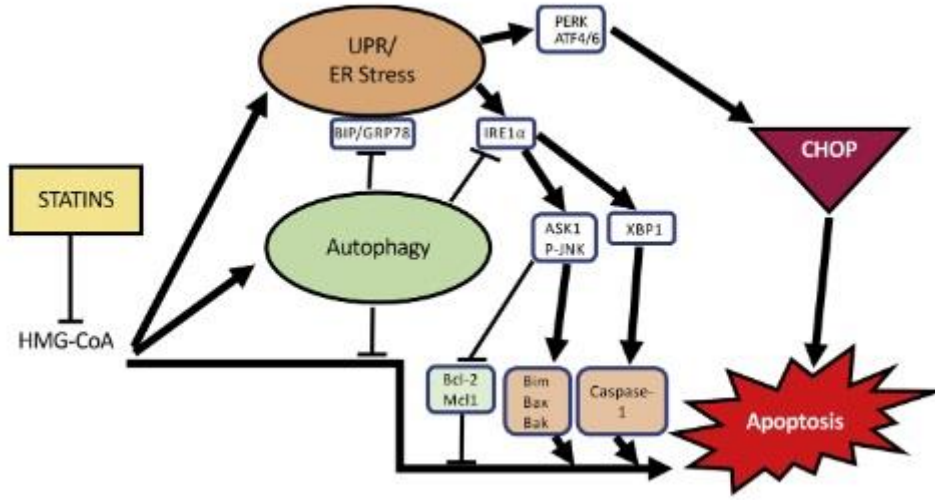
Şekil 2.8. ER stresinin çeşitli miyopatilerdeki rolü [70].

Vücutta diğer dokulardan daha fazla iskelet kası dokusu vardır ve metabolik aktivitenin çoğunluğunun organı olduğu için kas kusuru tüm vücudun sağlığını etkileyebilmektedir. Protein katlanma/bozunma dengesindeki bozukluklara, değişen Ca^{+2} ve lipid seviyelerine ve ER-mitokondri temaslarındaki değişikliklere bağlı ER stresi, son zamanlarda birçok farklı miyopatinin patojenik nedeni olarak kabul edilmiştir [71].

İskelet kası, insan vücudunda, fiziksel aktivite, metabolik bozulma ve hastalık koşulları gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak kapsamlı adaptasyona uğrayan oldukça esnek bir dokudur. ER, iskelet kası da dâhil olmak üzere birçok memeli hücre tipinde protein katlanması ve kalsiyum homeostazında önemli bir rol oynar [70]. Bununla birlikte, kronik olarak artan ER stresi, hücre ölümü de dâhil olmak üzere birçok patolojik sonuca da yol açtığı bilinmektedir. Biriken kanıtlar, ER stresinin neden olduğu katlanmamış protein cevabı yollarının, çoklu koşullarda iskelet kası kütlesinin ve metabolik fonksiyonun düzenlenmesinde çok önemli roller oynadığını göstermektedir. Ayrıca katabolik

durumlarda, dejeneratif kas bozukluklarında ve çeşitli miyopati tiplerinde iskelet kasında ER stress belirteçlerinin aktive oldukları gösterilmiştir [70].

Statinler ayrıca HMG-CoA'nın inhibisyonu yoluyla doğrudan ER stresine neden olabilirler. Büyük Doku Uyuşum Kompleksi (MHC-1)'in uyarılması, hücreleri kemokin ve sitokin ekspresyonu yoluyla ER stresinden korumaktadır. Bu, kendi kendine devam eden bir inflamatuvar tepkiye yol açar ve varsayımsal olarak MHC-1'in kendisi ER stres tepkisine neden olabilmektedir (Şekil 2.9) (72, 73). Nekrotik olmayan kas liflerinde MHC-1 ekspresyonunun uyarılması, kas lifinde ER stresinin bir göstergesidir, çünkü MHC-1 normalde kas liflerinin sarkomasında eksprese edilmez ve immün aktivasyonun bir belirteci olduğu düşünülmektedir. MHC-1'in farelerin iskelet kasında aşırı ekspresyonu, insan miyozitine benzer miyopati özelliklerine neden olmaktadır [74]. Statinler, ubikinon (oksidatif strese karşı koruma için önemlidir) ve selenoprotein (bir ER membran proteini) gibi metabolik ara maddelerin tükenmesi yoluyla ER stresine (MHC-1 ekspresyonunun artmasına) neden olabilir ve bunların her ikisinin de ER stresine karşı korumada önemli olduğu gösterilmiştir [75]. ER stresi, MHC-I ekspresyonunun uyarılması ve kas lifleri tarafından antijen sunumu, mevalonik asit, farnesol, geranilgeraniol ve ubikinon gibi ikincil metabolik ara ürünlerin tükenmesi, apoptozun indüksiyonu, kas bozukluğu dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla statin kaynaklı miyopatiye aracılık etmektedir [76].



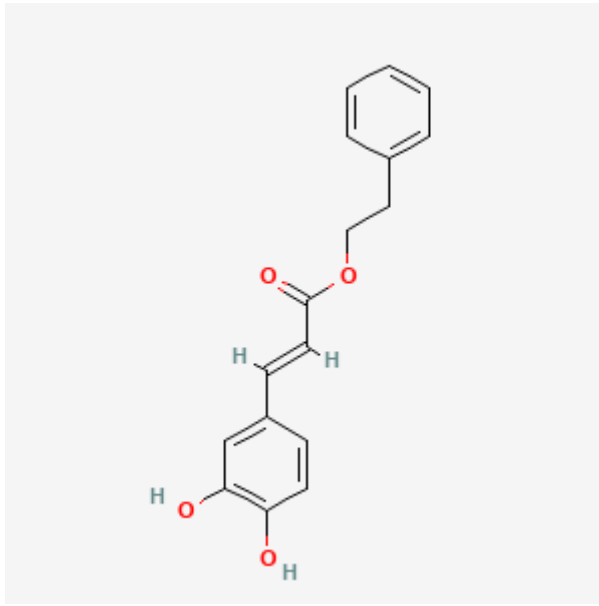
Şekil 2.9. Statin aracılı ER stresin olası biyokimyasal mekanizması [72].

Atorvastatin, NADPH oksidazın aktivasyonu için gerekli olan Rac1 GTPaz'ın membran translokasyonunu inhibe etmektedir. Küçük GTP bağlayıcı proteinler (veya GTPazlar), sinyal iletim yollarında moleküler düzenleyici görevi gören bir protein ailesidir. 21 kDa'lık bir protein olan Rac1, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi, gen transkripsiyonu ve hücre transformasyonunu içeren çeşitli biyolojik yanıt yollarını düzenleyen Rho GTPaz ailesine aittir. Diğer küçük GTPazlar gibi Rac1, aktif olmayan GDP'ye bağlı bir form ile aktif bir GTP'ye bağlı form arasında geçiş yaparak moleküler olayları etkilemektedir. GDP'ye bağlı ve GTP'ye bağlı durum arasındaki döngü, temel olarak iki farklı protein ailesi tarafından düzenlenmektedir: guanin nükleotid değişim faktörleri, GTP için GDP değişimini katalize ederek Rho proteinlerini aktive etmekte iken GTPaz aktive edici proteinler, GTPaz fonksiyonunu negatif olarak düzenlemektedir.

2.2. Kafeik Asid Fenetil Ester (CAPE)

Propolis, arıların kovani korumak için kullandıkları ve farklı coğrafyalarda ve arı tiplerinde farklı kimyasal bileşenlere sahip olabilmesine karşın [77] antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparaziter, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antioksidan gibi özellikler gösterdiği literatür verilerinden anlaşılmaktadır [78-81]. Bugüne kadar propoliste alifatik asitler, esterler, aromatik asitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, aldehytler, amino asitler,

ketonlar, kalkonlar, dihidrokalkonlar, terpenoidler, vitaminler ve inorganik maddeler dahil olmak üzere 300'den fazla farklı bileşik tanımlanmıştır [82]. Propoliste bulunan en umut verici biyoaktif bileşenlerden biri olarak ifade edilen CAPE [83]; 1987 yılında tam olarak tanımlanmış ve 1988 yılında Colombia Üniversitesi'nde sentezlenmesi başarılmıştır [84]. Moleküler formülü $C_{17}H_{16}O_4$ olan CAPE'in IUPAC adlandırması 2-phenylethyl (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate şeklindedir ve 284.31g/mol moleküler ağırlığa sahiptir (Şekil 2.10). Feniletil kafeat veya fenetil kafeat olarak da adlandırılabilir [85,86].



Şekil 2.10. CAPE'in kimyasal yapısı

2.2.1. CAPE'in kas hücreleri üzerine etkisi

CAPE, SIRT1 (silent information regulator 1) ve eNOS (endotelial nitric oxide synthase) genlerinin uyarılmasını sağlaması yoluyla miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını iyileştirebileceği ve bu anlamda kardiyoprotektif bir ajan olduğu literatür verilerinde vurgulanmaktadır. CAPE'in kalp kası koruyucu etkinlikte olduğu literatür verilerinde sıklıkla yer almasına rağmen iskelet kasları üzerindeki etkinliğine yönelik yeterli düzeyde yayına rastlanmamıştır [83].

2.2.2. CAPE'in otofaji üzerine etkisi

CAPE'den türetilen yarı sentetik bir bileşik olan fenetil kafeat benzoksanten lignan'ın kolon adenokasinoma hücrelerinde (WiDr) otofagozomları indüklediği gösterilmiştir [87,88]. Fakat başka bir çalışmada CAPE'in HepG2 hücrelerinde otofajiyi baskılayarak CdCl₂ kaynaklı toksikolojiye karşı koruyucu etkide olduğu rapor edilmiştir [89]. Western blot yoluyla insan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y'de, CAPE ile 4, 8 ve 12 saat tedaviden sonra otofagozom yapısının önemli bir bileşeni olan LC3-II proteininin ekspresyonunun arttığını bulmuştur [90]. Benzer şekilde, MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizileri kullanılarak yürütülen bir çalışma, CAPE'nin, LPS ile uyarılan hücrelerde LC3-I'den LC3-II'ye dönüşümde ve LC3-II'nin yukarı regülasyonunda bir artışa neden olduğunu bulmuştur [91,92].

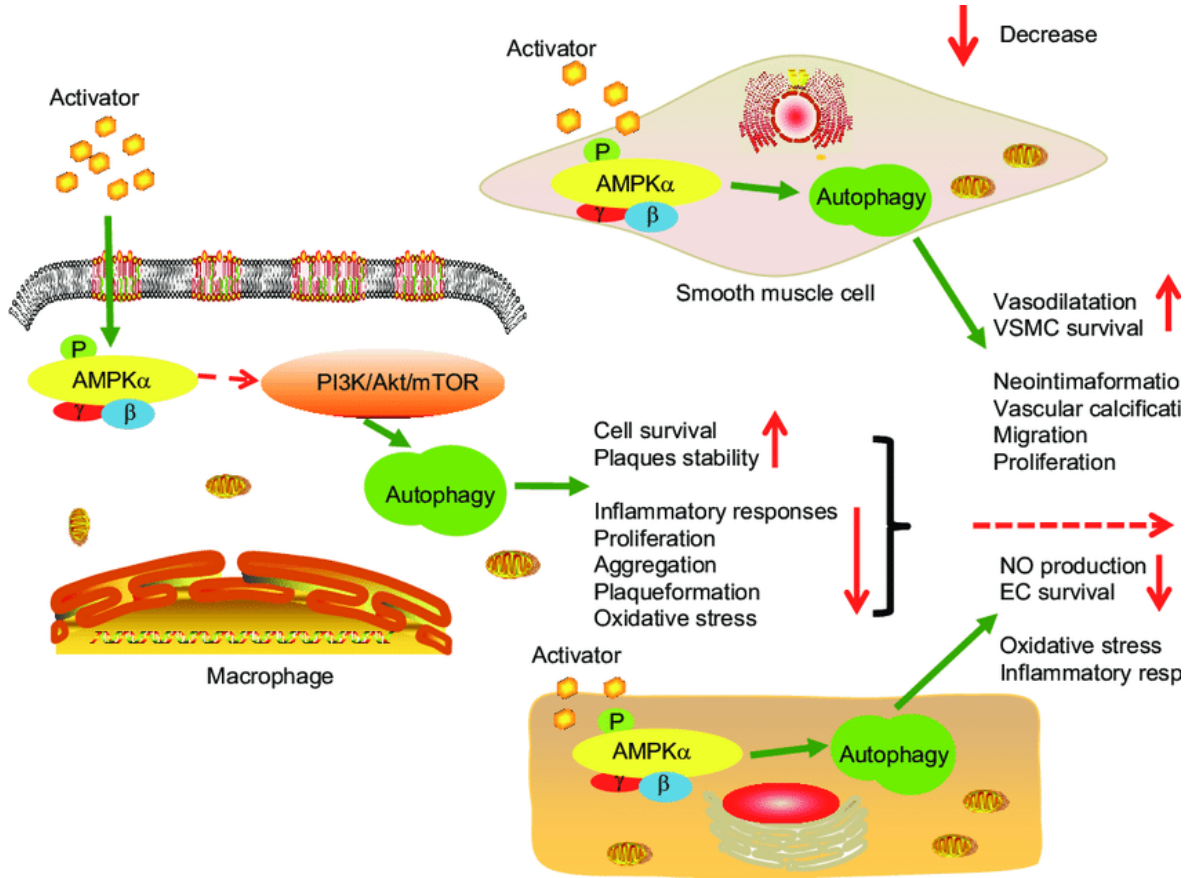
2.2.3. CAPE'in ER stresi üzerine etkisi

Shao ve arkadaşları 5mg/kg dozda imidakloprid uygulaması ile ratların karaciğerinde ER stress, oksidatif stress ve inflamasyonun oluştuğunu, bu ratlara 2,5 mg/kg dozda CAPE tedavisi uygulandığında ise ER stress, oksidatif stress ve inflamasyonun baskılandığını rapor etmişlerdir [93].

2.2.4. CAPE'in oksidatif stres üzerine etkisi

Oksidatif stres kaynaklı gonadal patolojilerin tedavisinde CAPE kullanımı tavsiye edilmiştir [94]. CAPE'nin antioksidan kapasitesi ve antienflamatuar etkisi nedeniyle Cd (II) tarafından oluşturulan böbrek hasarından korunmada etkili olduğu rapor edilmiştir [95]. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada CCl₄ maruziyetinin neden olduğu böbrek MDA düzeylerindeki artışın CAPE tedavisi ile önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir [96].

Özyurt ve arkadaşları güçlü serbest radikal süpürücü olan CAPE'in serbest radikal ataklarının neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarına karşı rat iskelet kaslarında koruyucu özellikte olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 2.11) [97].



Şekil 2.11. AMPK aktivasyonu ve otofaji [98].

Belirli AMPK aktivatörleri (berberin ve sirtinol), PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu aracılığıyla makrofaj otofajisini indükler ve bu yolla proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) ekspresyonu aşağı regüle edilirken anti-inflatuar sitokin (IL-10) ekspresyonu yukarı regüle edilir. Bu nedenle inflamasyon, makrofaj agregasyonu ve oksidatif stres inhibe edilir ve hücre sağkalımı ve plak stabilitesi artar. Endotelial hücrelerde AMPK aktivasyonu ve otofajisi, NO üretimini indükler, hücre sağkalımını artırır ve oksidatif stres ve inflammatuar yanıtı azaltır. AMPK aktivasyonu ve otofaji ayrıca hücre sağkalımını ve vazodilatasyonu teşvik eder, hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe eder ve damar düz kas hücrelerinde neointima oluşumunu ve vasküler kalsifikasyonu azaltır [98] (Şekil 2.11).

2.2.5. CAPE'in kolesterol biyosentezi üzerine etkisi

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan filogenetik olarak korunmuş hücre içi enerji sensörü olarak bilinmektedir. Bir katalitik alt birim ve 2 düzenleyici alt birimden oluşan heterotrimerik bir kompleks olan AMPK, hücresel enerji tükendiğinde aktive olur [99]. AMPK'nın aktivasyonu ile glikoz ve yağ asidi oksidasyonu dahil olmak üzere ATP üreten katabolik yollar hızlandırırken, aynı anda kolesterol biyosentezi, yağ asidi biyosentezi ve triasilgliserol biyosentezi dahil olmak üzere ATP tüketen anabolik yollar azaltılmaktadır [100,101].

AMPK'nın aktivasyonu ile kolesterol biyosentezinin azalmaktadır [100,101] CAPE ise AMPK'nın aktivasyonunu artırmaktadır [102]. Dolayısıyla CAPE AMPK üzerinden kolesterol biyosentezinin baskılanmasına neden olmaktadır.

Lee ve arkadaşları CAPE'nin metabolik rollerini anlamak için CAPE'nin iskelet kası hücrelerinde glukoz alımı üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve CAPE'nin iskelet kası hücrelerinde glukoz alımını uyardığını ve ayrıca AMPK'yi aktive ettiğini göstermişlerdir. Ek olarak, AMPK'nin inhibisyonu ile CAPE'nin neden olduğu glukoz alımının bloke olduğunu ve CAPE'nin AKT yolunu PI3K'ya (fosfoinositid 3-kinaz) bağımlı bir şekilde aktive ettiğini de rapor etmişlerdir [102].

3. Otofaji

Proteozom ve otofaji yolu olmak üzere hücrelerde iki ana yıkım/bozunma yolu vardır. Proteozomlar öncelikle kısa ömürlü proteinleri yıkar otofaji ise uzun ömürlü proteinlerin ve hasarlı veya gereksiz organellerin yıkılmasından sorumludur. Otofaji ayrıca hücre içi ve hücre dışı strese hücresel yanıtın bir parçasıdır. Normal şartlarda predispozan bir faktör (besin yoksunluğu, iskemi ve hipoksi gibi hücre dışı kuvvetlerden metabolik stres, hasarlı organeller ve katlanmamış ve/veya toplanmış proteinler) olmadıkça, normal hücrelerde otofaji nadiren tam ölçekte meydana gelir. Eğer bu predispozan faktörler uzun süreli varlık gösterirse, hücreler homeostazı sürdürmek için bazal otofajik aktivite gösterirler [103].

Otofaji organizmaların gelişme ve yaşlanma sürecinde yaygın olan fazlalık veya hasarlı organelleri ortadan kaldırmak için elverişli bir mekanizmadır. Otofaji süreci; hücrel protein metabolizmasında, atıkların uzaklaştırılmasında, yeniden yapılandırma, büyümede ve gelişmede önemli bir rol oynar [104]. Otofaji; morfolojik özelliklere ve ilgili moleküler mekanizmalara dayanarak, makrotofaji, mikrotofaji ve şapereon aracılı tofaji olmak üzere 3 alt tipe ayrılabilir. Diğer taraftan substratlar açısından bakıldığında, tofaji, tofajik paketin seçiciliğine bağlı olarak, seçici tofaji ve seçici olmayan tofaji olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Seçici olmayan tofaji, organellerin veya diğer sitoplazmik bileşenlerin lizozomlara rastgele taşınmasını ifade eder. Seçici tofaji ise bozunacak belirli bir substratın tanınmasına atıfta bulunur ve ayrıca aşağıdaki tiplere ayrılır: mitofaj, peksofaji, retikülofaji, nükleofaji, ribofaji, lipofaji, agrefaji ve ksenofaj [103].

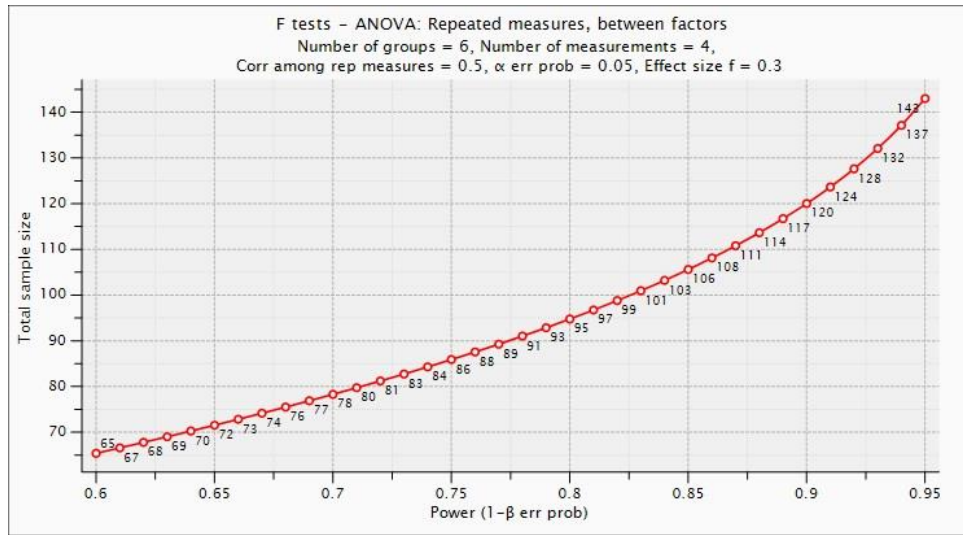
Normal koşullar altında, hücrel homeostazı sürdürmek için makrotofaji düşük bir seviyede tutulur. Açlık ve hipoksi gibi stres koşulları altında hızla indüklenebilir. Bu düzenleme, önemli tofaji proteinlerinin translyon sonrası modifikasyonları (fosforilasyon ve asetilasyon gibi) yoluyla sağlanır. Ek olarak, inflamasyon, oksidatif stres ve yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu gibi patolojik uyarılar, çeşitli hastalıkların ilerlemesinde bir faktör olabilecek makrotofajiyi aktive edebilir. Makrotofaji aktivitesindeki hem artış hem de azalma hızlı ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş süreçlerdir. İkincisi, aşırı tofajinin neden olduğu hasarı önlemektir. Makrotofajinin en tipik morfolojik özelliği, sitoplazmada çok sayıda vezikül oluşumudur. İlk önce sitoplazmada serbest bir membranöz yapı belirir ve sonra genişler. Küre şeklinde değildir, daha ziyade elektron mikroskobu ile tespit edilebilen fagofor olarak bilinen iki tabaka lipidden oluşan kase benzeri bir yapı alır. Kargoyu katladıktan sonra, bu zar çift tabakasına otofagozom denir. Otofagozom zarının kökeni hala belirsizdir. Çalışmalar endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, mitokondri ve hücre zarının olası otofagozom membran kaynakları olabileceğini göstermiştir [105-107]. Otofagozomun dış zarı lizozomla kaynaşır ve iç zar ve otofagozomun kapsüllenmiş maddeleri lizozoma girer ve lizozomal enzimler tarafından hidrolize edilir. Bu işlem, lizozoma giren maddeleri, hücreler tarafından yeniden kullanılan çeşitli besin bileşenlerine (örneğin, protein amino asitlere ve nükleik asitler nükleotitlere parçalanır) ayırır. Hücre içi bileşenleri içine alan lizozom, otofagolizozom veya otolizozom olarak adlandırılır [103].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Grupları

Çalışmada kontrol, atorvastatin, rosuvastatin, CAPE, atorvastatin+CAPE ve rosuvastatin+CAPE olmak üzere 6 deney grubu oluşturuldu. Her bir gruba bahsedilen ajanlar tek tek ve CAPE ile kombine edilmiş halde 24 saat süreyle IC₅₀ dozlarında maruz bırakıldı.

Deneyisel gruplar oluşturulmadan önce istatistiki açıdan kaç tane biyolojik tekrar ve kaç tane metod tekrarı yapılması gerektiğiyle ilgili g power analizi yapıldı. 6 gruplu deneyimizde 96 adet sonuç elde edildiğinde g power'ın 0,8 den büyük olacağı anlaşıldı (Şekil 3.1). Bu bakımdan deneyisel protokole her bir grup için 4 ayrı 100mm'lik hücre kültür petrilere ekim yapılmış ve her petriden elde edilen hücrelerde 4 metod tekrarı ile her bir grup için istatistiki çalışmalarda kullanılmak üzere 16 adet rakam/bulgu elde edilmiştir.



Şekil 3.1. G power analizine ait veriler.

3.2. Hücre kültürü

Hücrelerin homojen populasyonlarından oluşması nedeniyle hücre kültürleri günümüz fen ve sağlık bilimleri araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. İskelet kası hücreleri ile ilgili in vitro çalışmalarda değişik hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada insan rabdomiyosarkom hücre hatları olan RD hücre hatları kullanılmıştır. İlgili hücre hatları Türkiye ŞAP Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, enstitü kayıtlarında “RD/An2 Human embriyonel rhabdomyosarcoma, Hükük Kayıt No:94072101 “ olarak geçmektedir. Hücre kültürü flasklarının tabanına yapışan (adherative) karakterde olan RD hücre hatlarının büyütülmesi ve çoğaltılması basamakları aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Komple medium hazırlanışı

1. 50 ml ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Cat. No: FBS-HI-11A)
2. 5 ml penisilin streptomisin (Biological Industries, Ref. No: 03-031-1B)
3. 445 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Ref No: 41966-029) Bu marka ve referans numaralı DMEM ürünü içerisinde 4,5g/L glukoz, L Glutamin ve Sodyum pruvat hazır olarak gelmektedir.
4. İlk 3 basamakta belirtilen miktarlarda karıştırılan ilgili komponentler 500 ml'lik 0,22µm por çaplarına sahip membran filtreden (Corning, Cat. No: 430769) geçirilerek olası kontaminantlardan steril hale getirildi.

3.2.2. Hücrelerin canlandırılması

Laboratuvara ulaştığında dondurulmuş halde olan hücreler, 37°C benmaride (Daihan Scientific, Model: ECB-22) 3 dakikayı geçmeyecek şekilde çözündürüldüler. Hücrelerin dondurma işlemi esnasında üretici firma tarafından da bahsedilen Dimetilsülfoksit (DMSO)'den hücreleri kurtarmak maksadıyla hücreler aşağıdaki şekilde 3 kez yıkama

işleminde geçirilerek yukarıda hazırlanışı verilen komple medium içinde steril hücre kültür flasklarında 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildiler.

1. Önceden hazırlanmış ve benmaride 37 °C'e getirilmiş olan komple mediumdan 15 ml'lik steril falkon tüplerin içerisine 12 ml eklendi.
2. Çözündükten sonra toplamda 1,5 ml'lik hacime sahip olan hücre süspansiyonu falkon tüpün içerisinde hazır bulunan komple mediumun üzerine eklendi ve homojen bir şekilde karışması için nazikçe birkaç kez pipetaj yapıldı.
3. Hücre süspansiyonu 1000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve ardından falkonun dibinde pelet olan hücreler tekrar komple medium kullanılarak süspanse edildi.
4. Üçüncü adım en az 2 kez daha tekrar edildi.
5. Son yıkama işleminden sonra hücreler 5 ml komple medium ile son kez süspanse edilip 25 cm²'lik hücre kültür flasklarına toplam hacim 5 ml olacak şekilde alındı.
6. Hücreler invert mikroskop altında kontrol edildikten sonra inkübasyona bırakıldı.
7. 2 günlük inkübasyon sonunda hücrelerin 25 cm²'lik flaskların tabanına tamamen konflüye olmasının ardından üzerlerinden besiyeri ortamı tamamen çekildi ve flask tabanına yapışan hücrelere 1 ml (25 cm²'lik flask için) % 0,25 Trypsin-EDTA (Sigma, Cat No: T4049) eklenerek 37 °C'de en fazla 5 dakika bekletilerek hücrelerin Trypsin-EDTA solüsyonu içerisinde süspanse olmaları sağlandı.
8. Süspanse edilen hücreler tripsin etkisinden kurtulmaları için fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ya da komple medium kullanılarak 3. ve 4. adımlardaki gibi yıkama işlemine tabi tutuldu.
9. Son yıkama işleminin ardından falkon tüpün dibinde toplanan hücreler 10 ml komple medium kullanılarak süspanse edildi ve ardından 75 cm²'lik flasklara alındı.
10. Hücreler 3 günlük inkübasyonun ardından 75 cm²'lik flaskların tabanını tamamen doldurdu.
11. Hücreler daha fazla sayıda flaskta pasajlanmak üzere 7. ve 8. adımlarda belirtildiği şekilde falkon tüpün dibinde tekrar toplandı.
12. Bu aşamadan sonra (hücrelerin pasaj sayıları çok fazla artmadan) hücreleri yedeklemek amacıyla dondurma protokolü uygulanmıştır. Bunun öncesinde hücreler thoma lamı kullanılarak invert mikroskop altında sayıldı.

3.2.3. Thoma lamında hücrelerin sayılması

1. % 0,25 Tripsin-EDTA uygulaması ile flasklardan kaldırılan hücreler santrüfuj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre peleti 1,7 ml'lik ependorf godeler içerisinde 100 µl DMEM ile süspanse edildi ve bunun üzerine 100 µl Tripin Blue Solüsyonu (Biological Industries, Cat No: 03-102-1B) eklenip birkaç kez nazikçe pipetaj yapıldı.
2. Lamel önce hafifçe steril dH₂O ile nemlendirildi ve ardından thoma lamının üzerine kapatıldı.
3. Thoma lamının lamel ile kesiştiği noktalardan boyalı hücre süspansiyonu sayma kamarası tamamen dolana kadar kapiller etki ile otomatik pipet kullanılarak yavaş yavaş bırakıldı.
4. Hücreler sayma kamarasına homojen olarak dağılmaları için yaklaşık 1 dakika beklendi.
5. Thoma lamında invert mikroskop altında tam ortada gözlemlenen büyük karenin içinde toplanan hücreler sayıldı. Bu işlem esansında mükerrer sayım yapmamak adına büyük karenin sadece sol ve alt kenarına düşen hücreler sayıya dâhil edildi.
6. 1 büyük karede saydığımız toplam hücre sayısını önce 10^4 daha sonra da 2 ile çarparak (tripin blue uygulaması ile 2 katlık bir dilisyon oluştuğu için) 1 ml'de kaç tane hücre olduğu tespit edildi (Büyük karenin bir kenarının uzunluğu 1mm, thoma lamı ile lamel arasında kalan mesafe (yükseklik) ise 0,1 mm olduğu için 1 büyük karede sayılan hücreler $0,1 \text{ mm}^3$ 'lük hacimdeki sayıyı vermektedir. Sayılan hücre sayısını 10^4 ile çarptığımızda ancak 1 ml'lik hacme ulaşabilmekteyiz).

3.2.4. Hücrelerin dondurulması

1. Hücre sayımında tam konflüye olmuş 1 adet 75 cm^2 'lik hücre kültür flaskında yaklaşık 9×10^6 RD hücresi oluştuğu tespit edildi. Bu hücrelerden 3×10^6 tanesi kullanılarak dondurma protokolüne alındı.
2. Hücreleri süspanse etmek için içerisinde %10 DMSO bulunan FBS dondurma solüsyonu hazırlandı.
3. Hücreler 2 ml'lik cryo viallerin (VWR Cat No:10018-754) içerisine 1,5 ml dondurma solüsyonu içerisinde yüz bin hücre olacak şekilde dağıtıldılar. Böylelikle toplamda 3 milyon hücreden 30 adet 1,5 ml hacimde yüz bin hücre bulunan porsiyonlar elde edildi.
4. Bu cryo viallerin etrafı havlu peçete ile sarıldı ve 4 saat -20°C 'de bekletildiler.

5. 4 saatin sonunda hücreler uzun süre saklanabilecekleri -152 °C'lik croyogenik dondurucuya (PHCBI Cat. No: MDF-1156-PE) alındılar.
6. Kalan 6×10^6 hücre yaklaşık 2×10^6 olacak şekilde 3 ayrı 75 cm²'lik hücre kültür flaskına ekilerek çoğaltılmaya devam edildiler.

3.3. Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE Doz Belirleme Çalışmaları

Literatür verilerden hareketle RD hücre hatlarına Atorvastatin ve Rosuvastatin için IC₅₀ dozu uygulandı [108-110]. IC₅₀ dozu farmakoloji için temel kavramlardan bir tanesidir ve yanıtın (veya bağlanmanın) yarı yarıya azaldığı bir inhibisyon konsantrasyonunu ifade etmek için kullanılır. Bu bağlamda CAPE'in statinlerin neden olduğu sitotoksiteye karşı etkinlikte olup/olmadığını araştırmada da IC₅₀ dozu kullanıldı. Benzer şekilde literatürde sitotoksite karşıtı koruyucu ajanlar için uygulanan dozlar IC₅₀ dozları olmuştur. Örneğin; Zou ve arkadaşları cisplatinin neden olduğu sitotoksiteye karşı KB, BEL7404, K562, and Eca109 hücre hatlarında CAPE'in IC₅₀ dozunu uygulamışlardır [111]. Başka bir çalışmada Xia ve ark. Çeşitli kafeik asid analoglarını sentezleyip bunların HIV-1 entegrasyonuna ve kanser hücre hatlarına karşına biyoaktivetlerini araştırdıkları çalışmalarında CAPE'i IC₅₀ dozunda uygulamışlardır [112]. Yine bir başka çalışmada Chen ve arkadaşları feruloyl ve caffeoyl türevlerinin antitümör etkinliğini araştırırken ilgili koryucu ajanların IC₅₀ dozlarını hücre kültürü çalışmalarında kullanmışlardır [113].

3.3.1. MTT hücre viabilite testi ve IC50 doz hesaplamaları

1. 96 kuyucuklu well platelere her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler flask tabanına yapışıp tabanın %70'ini kapladığında IC₅₀ doz belirleme çalışması için ajanların uygulamasına geçildi.
2. Atorvastatin Ca (Adooq Bioscience, Cat No: A11800), Rosuvastatin (Adooq Bioscience, Cat No: A10810) ve CAPE (Selleckchem, Cat. No: S7414)'in 24 saat süreyle 8 tekrar olacak şekilde 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM, 500 µM ve 1000 µM konsantrasyonlarında 8 farklı dozu uygulandı.
3. Tüm ajanlar DMSO'da çözöldüğü için kontrol grubu hücrelerine %0.05 lik DMSO uygulandı.
4. 24 saatin sonunda ajan bulunan mediumlar taze ve FBS'siz mediumla ile değiştirildi.

5. Her bir kuyucuğa 100µl medium hacmine 10 µl MTT solüsyonu (5mg/ml) eklenerek 4 saat 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava ortamında inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltıldı, oluşan formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözünerek 570 nm dalga boyunda Optik Dansite (O.D.) değerleri ELISA readerda (Epoch, Biotek, USA) okundu.
7. Konsantrasyon ve O.D. değerleri GraphPad Prism Version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programına girilip konsantrasyonların logaritmalarının normalize edilmiş O.D. değerlerine göre grafiğe geçirilip IC₅₀ dozları hesaplandı.

3.4. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

2,2x10⁶ hücre olacak şekilde 100 mm'lik steril hücre kültürü petri kaplarına (VWR, PA, USA) hücrelerin ekimi yapıldı. Petri kabı tabanını %70 kaplayan hücre hatlarına belirlenen IC₅₀ dozlarında (Şekil 4.1) 24 saat boyunca Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE uygulaması yapıldı. İnkübasyon sonunda medium atıldı ve hücrelerden buz üzerinde lizis buffer (%1 TritonX 100, 50mM HEPES Buffer, 100mM Na₂HPO₄.2H₂O, %8 protease inhibitor cocktail) uygulaması ile lizatlar elde edildi. İlgili lizatlardan BCA metodu (TaKaRa, Shiga, Japan) ile total protein ölçümü yapıldı.

3.4.1. Lizis buffer malzeme listesi

1. 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli (Roche Complete, Cat. No: 04.693.116 001) 50 ml'de çözüldü (500 ml lizis buffer için bunun 40 ml'si kullanıldı).
2. 7,8 gram Na₂HPO₄.2H₂O (MERCK, Cat. No: 1.06345.1000)
3. 25 m HEPES Buffer (Biological Industries, Cat. No: 2036697)
4. 5 ml Triton-X 100 (BioShap, Cat. No: OB64740)
5. 10 ml 0,5 M EDTA (SERVA, Cat. No: 39761.02) (TAC ve TOC çalışmalarında EDTA olmayan lizis buffer kullanılmıştır).

3.4.2. Lizis buffer hazırlanışı

1. 500 ml'lik balon jojeye bir miktar dH₂O alındı. Tartılan 7,8 Na₂HPO₄.2H₂O çözününceye manyetik karıştırıcıda (VELP Scientifica Model ARE, Italy) orta hızda karıştırıldı.
2. Üzerine 25 ml HEPES Buffer eklendi.
3. Üzerine 40 ml Proteaz İnhibitör Kokteyli eklendi.
4. Üzerine 5 ml Triton-X 100 eklendi.
5. Üzerine 10 ml 0,5M EDTA eklendi.
6. Üzerine dH₂O eklenerek son hacim 500 ml'e tamamlandı.

3.5. BCA Metodu ile Total Protein Ölçümü

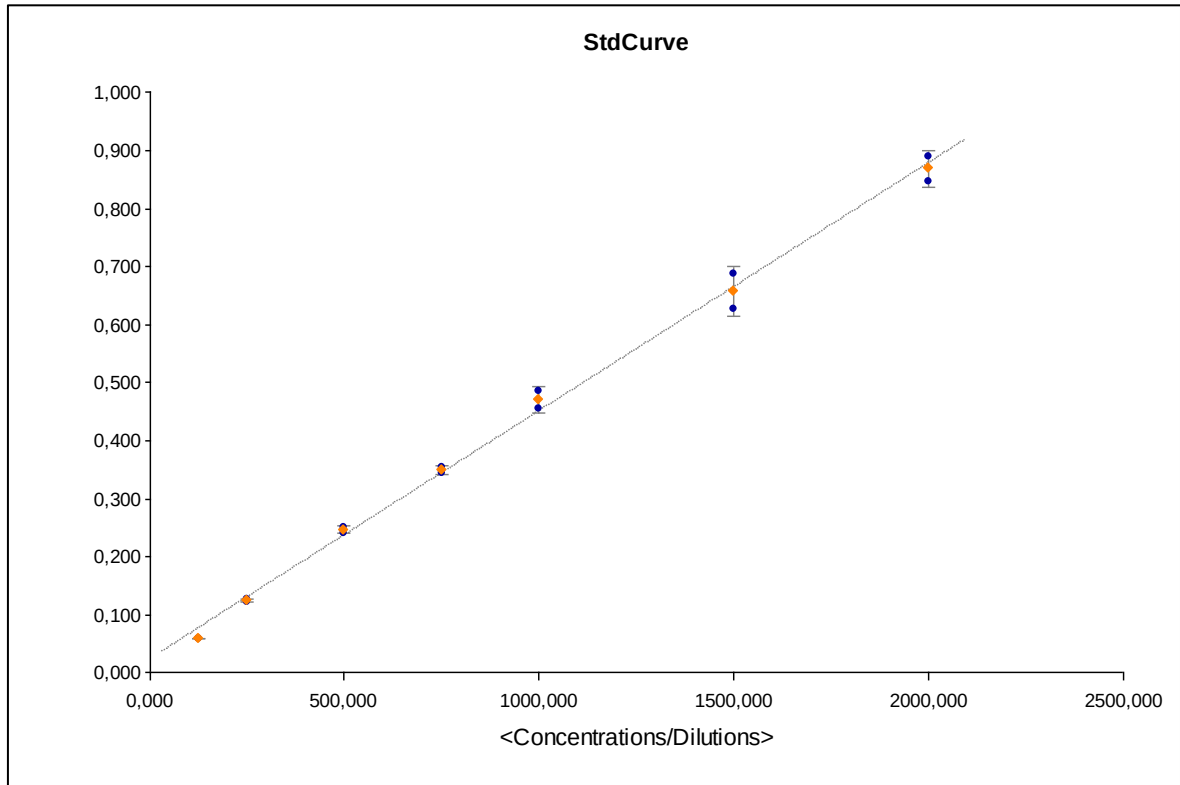
Total protein ölçümü için TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TAKARA BIO INC. Cat. No: T9300A) kullanıldı. Kit içerisinde sunulan tüm reaktifler deneysel protokol başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi. Reaktif A ve reaktif B 100:1 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Toz halde verilen Bovine Serum Albumin (BSA) standardı dH₂O kullanılarak aşağıdaki tabloda verilen konsantrasyonlarda hazırlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. BSA Standartlarının Hazırlanışı

2 mg/ml BSA Standart (μ l)	Dilüent (dH ₂ O)	Final Konsantrasyon(μ g/ml)
120	0	2000
90	30	1500
60	60	1000
45	75	750
30	90	500
15	105	250
10	150	125
0	120	0 (Blank)

1. Reaksiyonlar için 96'lık well plateler kullanıldı.
2. Her bir deney grubundan elde edilen hücre lizatları ve standartlar dublike çalışıldı.

3. Boş kuyucuklardan her bir standart ve numune kuyucuğuna 10 µl standart/numune eklendi.
4. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl çalışma solüsyonu eklendi.
5. 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda ELISA mikrolaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda blanke karşı absorbens değerleri okundu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Total Protein Standart Curve Grafiği (R^2 : 0,996)

3.6. Total Oksidan-Antioksidan Kapasite Analizleri

Son yıllarda plazma (serum) veya doku örneklerinde oksidatif stresi belirleyebilmek amacıyla total oksidan ve total antioksidan düzeylerini, aktivitelerini ve kapasitelerini belirlemeye yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, analizi yapılacak numunenin total oksidan kapasitesi (TOC) ve total antioksidan kapasitesi (TAC) belirlenmekte, böylelikle oksidatif stres ile ilgili bir yorum yapılabilmektedir [114]. Total antioksidan kapasite (TAC) ve total oksidan kapasite (TOC) ölçüm kitleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla, analizi yapılan numunedeki glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH), katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD) gibi antioksidanların ve

malondialdehit (MDA), nitrik oksid (NO) gibi oksidanların düzeylerinin ölçümleri sonucu elde edilen bulguların korelasyon gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Nitekim oksidan ve antioksidan maddelerin ölçümleri ayrı ayrı yapılsa bile, oksidatif strese ilişkin bir yorum yapılırken, bu veriler bir araya getirilerek bir sonuca ulaşılmaya çalışılmaktadır [115-117]. Bu nedenle, deneysel hücre kültürü izolatlarından elde edilecek hücre kültürü ekstraktlarından; total antioksidan kapasite (TAC) ve total oksidan kapasite (TOC) ölçümleri yapılacaktır.

3.6.1. Total antioksidan kapasite (TAC) analizi:

Ölçüm Erel'in geliştirdiği metoda göre [114], numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirilecektir. Metot; numunede bulunan antioksidanların, kullanılan ayıraçlardaki koyu yeşil renkli ABTS+ (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) radikal katyonunu indirgeyerek ABTS molekülüne dönüştürmesi esasına dayanır. Numunede bulunan antioksidan miktarına bağlı olarak değişebilen, ABTS+ radikalinin ABTS'ye indirgenme oranı attıkça, koyu yeşil olan renk açılmaya, beyazlaşmaya başlamaktadır. Spektrofotometrede 660 nm'de okunan absorban değerlerinin değişimi, numunede bulunan total antioksidan düzeylerine bağlıdır. Ölçüm genelde TAC analizlerinde kullanılan, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilir. Ölçülen TAC düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilecektir.

Ölçüm TAC kiti (Rel Assay, Cat. No:RL0024) kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre aşağıdaki sıralama izlendi.

1. Tüm deneysel işlemler 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak yapıldı.
2. Önce tüm kuyucuklara 12 µl standart/numune pipetlendi ve üzerine 200 µl reaktif 1 eklendi.
3. İkinci basamak 30 sn içerisinde tamamlanması gerektiği için reaktif 1 dispenser (Brand Handy Step, Cat No:20K59584) kullanılarak hızlı bir şekilde eklendi.
4. 30 saniye içinde mikrolaka okuyucu kullanılarak 660 nm dalga boyundaki absorban değerleri okundu ve kaydedildi (Abs 1).
5. Daha sonra her bir kuyucuğa 30 µl Reagent 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

6. 10 dakika sonunda mikropilaka okuyucuda 660 nm dalga boyunda absorbands okundu ve kaydedildi (Abs 2).
7. Blank olarak dH₂O, standart olarak 1,0 TroloxEquiv/L kullanıldı.
8. $\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_2 - \text{Abs}_1$ eşitliğinden her bir numune, standart ve blank (dH₂O) için ΔAbs bulundu.
9. $\text{TAC} = (\Delta\text{Abs}_{\text{H}_2\text{O}} - \Delta\text{Abs}_{\text{numune}}) / (\Delta\text{Abs}_{\text{H}_2\text{O}} - \Delta\text{abs}_{\text{standart}})$ eşitliğinden hesaplandı.

3.6.2. Total oksidan kapasite (TOC) analizi:

Ölęüm yine Erel'in geliştirdiği metoda göre [118], numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak geręekleřtirildi. Metot; numunede bulunan oksidanların analizde kullanılan ayırağtaki ferrous (Fe⁺²) iyon komplekslerini okside ederek ferrik (Fe⁺³) forma dönüştürme esasına dayanmaktadır. Oksidasyon reaksiyonu sonucu miktarı artan ferrik iyonlar, reaksiyonun asidik ortamında bulunan kromojen (kendisi renksiz fakat oksidasyon gibi etkilerle renkli bir bileşik oluşturan madde) ile renkli bir kompleks oluştururlar. Oluşan rengin yoğunluğu numunede bulunan oksidan maddelerin toplam miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu değişimler spektrofotometrede 560 nm'de ve 800 nm'de okuma yapılarak belirlendi. TOC analizi hidrojenperoksit (H₂O₂) ile kalibre edildi ve sonuçlar hidrojenperoksit equivalent litre ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$) olarak ifade edildi.

Ölęüm TOC kiti (Rel Assay, Cat. No: RL0017) kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre aşağıdaki sıralama izlendi.

1. Tüm deneysel işlemler 96 kuyucuklu mikropilakalar kullanılarak yapıldı.
2. nce tüm kuyucuklara 30 μl standart/numune pipetlendi ve üzerine 200 μl Reagent1 eklendi.
3. İkinci basamak 30 sn içerisinde tamamlanması gerektiği için Reagent 1 dispenser (Brand Handy Step, Cat No:20K59584)ile hızlı bir şekilde eklendi.
4. 30 saniye içinde mikropilaka okuyucu kullanılarak 530 nm dalga boyundaki absorbands değerleri okundu ve kaydedildi (Abs 1).
5. Daha sonra her bir kuyucuğa 10 μl Reagent 2 eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

6. 10 dakika sonunda mikrolaka okuyucuda 530 nm dalga boyunda absorbands okundu ve kaydedildi (Abs 2).
7. $\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_2 - \text{Abs}_1$ eşitliğinden her bir numune/standart için ΔAbs bulundu.
8. $\text{TOC} = \Delta\text{Abs}_{\text{numune}} / \Delta\text{Abs}_{\text{standart}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$ eşitliğinden hesaplandı.

3.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

TAC ve TOC ölçümleri yapıldıktan sonra, oksidan ve antioksidan dengeye ilişkin daha net yorum yapabilmemize olanak veren oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı [114, 118, 119].

OSI hesaplaması aşağıda belirtilen eşitliğine göre yapıldı.

$$\text{OSI} = [(\text{TOC}, \mu\text{mol/L}) / (\text{TAC}, (\text{mmolTroloxEquiv/L}) \times 100]$$

3.8. Otofaji Assay

Geleneksel bir floresan prob olan monodansilkadaverin, lizozomal / otofajik vakuoller için yararlı bir floresan işaretleyici olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, yüksek arka plan ve zayıf flüoresan sinyali ürettiği bilinmektedir. Otofaji assay; floresan mikroskobu, flow sitometri ve floresans mikrolate testi ile canlı hücrelerde otofajinin saptanması için optimize edilmiştir. Test, hücresel düzeyde otofajik aktiviteyi izlemek için hızlı, spesifik ve niceliksel bir yaklaşım sağlamaktadır. Otofaji saptama kitinde sağlanan 488 nm-uyarılabilir yeşil floresan saptama reaktifi, otofaji sırasında üretilen veziküllerde parlak şekilde floresan hale gelir ve otofaji yollarını modüle ettiği bilinen çok çeşitli koşullar altında doğrulanmıştır. Rapamisin ve açlık, otofajinin iyi bilinen indükleyicileridir. Klorokin, lizozomal bir inhibitördür. Rapamisin ve Klorokin, kitte pozitif kontroller olarak yer almaktadır. Kitte hücresel çekirdekleri vurgulamak için bir nükleer karşı boyama da sağlanmıştır. Bu canlı hücre analizi kiti, hücresel düzeyde otofajinin düzenlenmesinin analizi için uygun bir yaklaşım sağlamaktadır.

Otofaji çalışması, Otofaji Assay Kit (Sigma, Cat. No: MAK138) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Deney için 96 kuyucuklu mikro plakalara her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre ekimi yapıldı.
2. Tüm kuyucuklar %70-%80 konflüye olduğunda tüm gruplara ait ajan uygulamaları yapıldı.
3. Pozitif kontrol olarak bir grup hücre açlıkla muamele edildi.
4. 24 saatlik uygulama süresi bitimine 30 dakika kala otofagozom saptama reaktifi hazırlandı. Bunun için 20 μ l 500X solüsyonu 10 ml Stain Buffer ile seyreltildi (Bu hacim 96 plakalı okuyucunun tamamı için yeterlidir).
5. 24 saatlik uygulama süresi bitiminde içinde deneysel ajanları içeren besiyeri ortamı kuyucuklardan uzaklaştırıldı.
6. Kuyucukların kurumasına müsaade edilmeden dispencer yardımı ile hızlıca her bir kuyucuğa 100 μ l otofagozom saptama reaktifi eklendi.
7. Hücreler bu halde doğal büyüme ortamları olan 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosferde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. 30 dakika sonunda kuyucuklardan otofagozom saptama reaktifi çekildi ve hücreler kitle beraber verilen yıkama tamponu ile multikanal pipet (Brand Transferpette S, Cat. No: BR705912) kullanılarak her defasında 300 μ l hacimde 4 kez yıkandı.
9. Floresans yoğunluğu floresan mikroskopunda (Zeis, Axio Observed Z1) mikroskop kamerası (Zeis, Axiocam 506 mono) kullanılarak fotoğraflandı.
10. Fotoğraflardaki floresan şiddeti image j (version 1.53t) fotoğraf analiz programı kullanılarak analiz edildi.

Otofaji analizleri sonrasında her bir grup için image j programından elde edilen entegre yoğunluklar, kontrol grubu 100 kabul edilerek, kontrol grubuna kıyasla % otofaji değerleri olarak hesaplandı ve grafiğe geçirildi (Şekil 4.11 ve şekil 4.12).

3.9. Total RNA İzolasyonu

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak yapılacak transkripsiyon analizlerinde kullanılacak total RNA hazır ticari kit (EURX, GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Cat. No: E3598) yardımı ile aşağıdaki basamaklar takip edilerek elde edildi.

1. Çalışmada her bir grup için, 100mm'lik steril petri kaplarında üretilen, en az 5×10^6

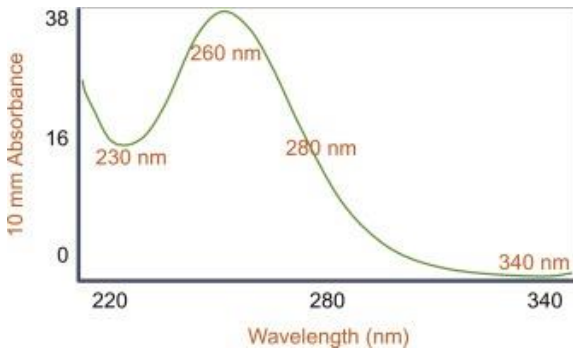
hücre izolasyon protokolüne alınmıştır.

2. Thoma lamında yapılan hücre sayımı neticesinde tam konflüye olmuş her bir 100mm'lik steril petri kabında ortalama $8,8 \times 10^6$ adet hücre ürettiği RNA izolasyon protokolünden önce tespit edilmişti.
3. Çalışmaya başlamadan önce her 1 ml RL buffer için 10 µl beta merkaptotanol eklenerek lizis buffer hazırlandı.
4. Hücre kültür ortamında bulunan fenol kırmızısı izole edilen total RNA ile kontamine olduğunda UV spektrum ölçümlerini değiştirebildiği ve ayrıca PCR reaksiyonunu da inhibe ettiği literatür verilerinde bulunmaktadır [120]. Bu sebeple her bir petrideki hücreler RNA izolasyon protokolüne alınmak üzere kazınmadan önce soğuk PBS ile 3 kez yıkandı (Bu aşama fenol kırmızısı kontaminsayonunu engellemek açısından oldukça önemlidir).
5. Her bir petriye 400 µl lizis buffer eklenerek Cell Scraper (VWR, Cat. No: 734-0386) yardımı ile hücreler petrinin tabanından kazındı.
6. Kazıma işlemi sonrasında lizis tampon içerisinde süspansiyon oluşturan hücrelerin parçalanmasını hızlandırmak için tampon jelimsi yapı kazanana kadar buz üstünde nazikçe pipetaj yapıldı.
7. Oluşan jelimsi lizat petriden otomatik pipet yardımı ile homojenizasyon spin kolona alındı.
8. Homojenizasyon spin kolon 11.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası lizatın homojenizasyon spin kolondan toplama tüpüne geçip geçmediği kontrol edildi ve tüm gruplarda lizatın toplama tüpüne geçtiğinden emin olundu.
10. Lizatı süzmüş olan homojenizasyon spin kolonlar santrifüjden buz kaşesi/Cooler (Agilent, Strata Cooler LP Benctop Cooler, Cat. No: 401349) üzerine çıkarıldı ve üzerlerine %96-100'lük etanolden (MERCK) 250 µl eklenip kendiliğinden süzülmesi beklendi.
11. Etanolde süzüldükten sonra homojenizasyon spin kolonlar atıldı. Toplama tüpüne toplanan süzüntü RNA Binding Spin Kolana aktarıldı ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpüne geçen süzüntü döküldü.
12. Toplama tüpüne tekrar yerleştirilen RNA Spin Kolana 400 µl Wash DN1 eklenip 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edildi.
13. Toplama tüpü yine boşaltılıp RNA Spin Kolana tekrar yerleştirildi.
14. 600 µl Wash RBW Buffer eklendi ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

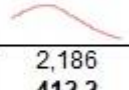
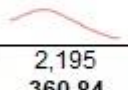
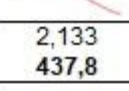
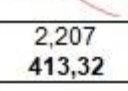
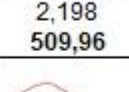
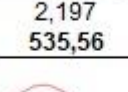
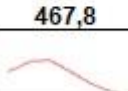
15. Toplama tüpü bir kez daha boşaltılıp RNA Spin Kolana tekrar yerleştirildi.
16. İkinci ve son kez tekrar 300 µl Wash RBW Buffer eklenip 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilip toplama tüpü içindeki süzüntüyle beraber atık kabına atıldı.
17. RNA Binding Spin Kolon yeni ve steril bir ependorf godeye oturtulup üzerine 50 µl RNase Free Su eklenip 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
18. Bu son santrifüj işlemi neticesinde steril ependorf godenin içinde saf RNA toplandı ve Epoch Biotek Take3 plate'de RNA miktar ve saflık tayini için hazır hale getirildi.
19. RNA saflık ve miktar tayini sonrası cDNA sentezinde kullanılmak üzere hangi gruptan kaç µl total RNA kullanılacağı tespit edildi ve kalan kullanılmayan total RNA izolatları olası B planı için -20 °C'de muhafaza edildi (RNA izolasyon protokolün her aşamasında soğuk zincirin muhafazasına azami derecede özen gösterildi).

3.9.1. Total RNA'nın saflık ve miktarının ölçülmesi

Total RNA izolasyonu sonrası mikropate spektrofotometre (Agilent Epoch Biotek,USA) cihazının Take3 plate aparatı kullanılarak 1 µl total RNA izolatında kaç ng RNA bulunduğu tespit edildi. Bunun yanında ultraviole spektrofotometri ölçümleri ile belirlenen 260nm/280nm oranı hesaplanarak grafik üzerinde RNA'nın saflık derecesi de gösterildi (Şekil 3.3). Ultraviole spektrofotometri ölçümleri ile belirlenen 260nm/280nm oranı ~2 olan izolatlarda RNA'nın saf olduğu kabul edildi ve bu RNA izolatları cDNA sentez reaksiyonlarında kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Nükleik asitlerin maksimum absorbansı 260 nm dalga boyunda gerçekleşir [121].

	2	3	
Kontrol			Spectrum
	2,197 641,4	2,202 640,12	260/280 ng/ μ L
Rosuvastatin			Spectrum
	2,186 412,2	2,195 360,84	260/280 ng/ μ L
Ros CAPE			Spectrum
	2,133 437,8	2,207 413,32	260/280 ng/ μ L
CAPE			Spectrum
	2,198 509,96	2,197 535,56	260/280 ng/ μ L
Atorvastatin			Spectrum
	2,206 486,2	2,21 467,8	260/280 ng/ μ L
Ato CAPE			Spectrum
	2,201 375,72	2,211 380,92	260/280 ng/ μ L

Şekil 3.4. RNA miktarları (ng/ μ L) ve 260/280nm oranları.

3.10. cDNA Sentezi

cDNA sentezi hazır ticari kit (A.B.T, Cat. No: C03-01-20) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Reaksiyon tüplerine sırasıyla 2 μ L 10 X Reaksiyon Buffer
2. 2,5 mM dNTP karışımından 1 μ L
3. 50 μ M Random hexamer içeriğinden 2 μ L
4. 1 μ L'de 200 U'e bulunan Reverse transkriptaz enziminden 1 μ L
5. RNase inhibitörden 0,5 μ L
6. Her bir gruptan reaksiyon karışımına template RNA olarak 1 μ g/ μ L konsantrasyonu uygulanmıştır.
7. Buraya kadar eklenen komponentlerin toplam hacmi 6,5 μ L'dir. Kitin tavsiye ettiği reaksiyon hacmi 20 μ L'dir. Buna göre su ve template RNA karışımının toplam hacmi 13,5 μ L olmalıdır. Bu bağlamda her bir gruptan eşit miktarda template RNA eklenmesi için su ve template RNA'ların reaksiyon hacmine farklı miktarlarda ve son hacimde

tüm tüplerde 1 µg/ µl konsatrasyonda template RNA olacak şekilde hesaplandı ve buna göre pipetlendi.

8. Reaksiyon karışımına eklenen tüm komponentler 0,2 ml hacimdeki 8'li PCR striplerinin (Axygen, Cat. No: 12667212) içerisine alındı ve reaksiyon bu tüplerin içerisinde gerçekleştirilip oluşturulan cDNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.10.1. cDNA sentez reaksiyonu

Kitin tavsiye ettiği hacimlerde reaksiyon karışımı yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandı ve reaksiyon aşağıdaki döngü kullanılarak konvansiyonel PCR cihazı (BIORAD T100 Thermal Cycler) yardımı ile gerçekleştirildi.

25 °C'de 10 dakika

37 °C'de 120 dakika

85 °C'de 5 dakika

4 °C'de ∞

3.11. Real Time QRT-PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri

Real Time PCR sisteminde sybr green boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışığa yapar ve bu ışığa sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. RT-PCR çalışmalarında kullanılacak olan primerlere ait forward ve reverse primerlerinin listesi aşağıdaki gibi dizayn edildi. İlgili gen bölgelerine ait mRNA sekansları NCBI genbank veri tabından alınarak primer 3 programı yardımıyla oluşturuldu. Ayrıca literatürde aynı primer dizinini kullanan çok sayıda makaleye rastlandı ve kanıtlayıcı olması açısından bazılarına atıflar yapıldı.

ATF 4 (Activating transcription factor 4):

Forward primer : 5'-GGGACAGATTGGATGTTGGAGA-3' [122,123]

Reverse primer : 5'-ACCCAACAGGGCATCCAAGT-3' [122,123]

Termal Profil: 95 °C’de 5 dakika 1 siklus tutulduktan sonra 40 siklus 95 °C 15 saniye/60°C 60 saniye/72 °C 30 saniye

CHOP (DNA damage inducible transcript 3):

Forward primer: 5’- CTCCCAGAGCCCTCACTCTC-3’ [124,125]

Reverse primer: 5’- TGCTTGAGCCGTTTCATTCTC-3’ [124,125]

Termal Profil: 95 °C’de 5 dakika 1 siklus tutulduktan sonra 40 siklus 95 °C’de 15 saniye/°C’de 60 saniye/°C’de 30 saniye

Beta Aktin (House Keeping gen olarak):

Forward primer: 5’- CTCCATCCTGGCCTCGCTGT- 3’ [126]

Reverse primer: 5’- GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3’ [126]

Termal Profil: 95 °C 2 dakika 1 siklus tutulduktan sonra 35 siklus 95 °C’de 30 saniye/62 °C’de 30 saniye/72 °C’de 45 saniye

3.12. Flow Sitometri

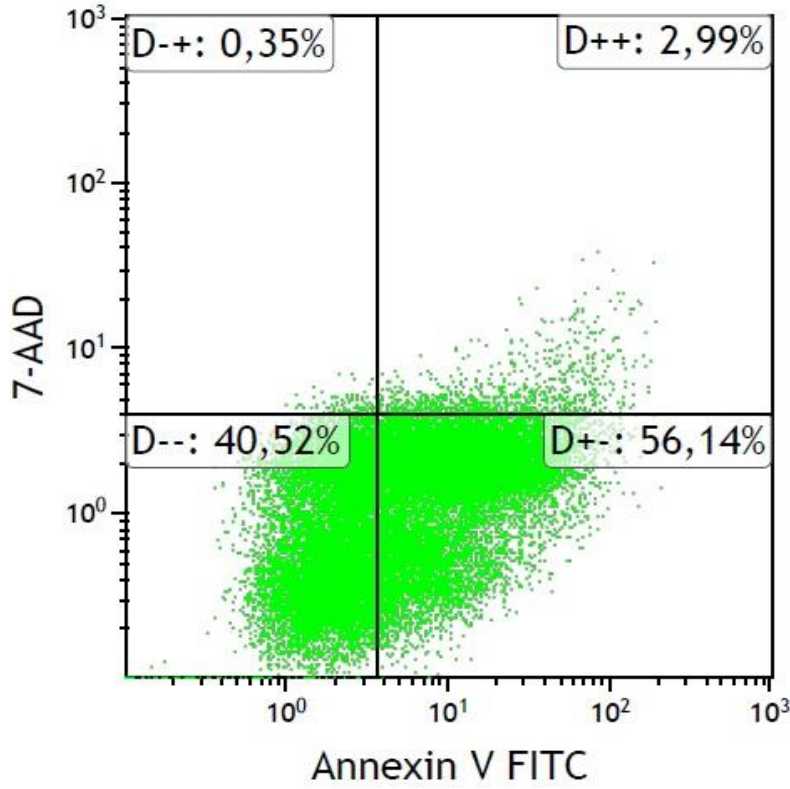
Akış sitometri; hareket halinde olan bir akışkanın içinden geçirilen hücre veya partiküllerin özelliklerinin ölçülmesi esasına dayanır. Hücreler lazer ışığın önünden geçerken ışık çeşitli dalga boylarında kırılır ve hücrelerin verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyaller hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerine ve hücreye bağlanan çeşitli florokromlara göre farklılık gösterir. Bu yöntemle hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir [127].

Plazma membranındaki değişimler apoptozun erken özelliklerindedir. Apoptotik hücrelerde, membrane fosfolipiti ve fosfatidilserin (PS) plazma membranının iç ve dış tarafında yer değiştirir. Böylelikle, PS dış hücresel çevre ile maruz kalır. Annexin V 35-36kDa boyutunda ve Ca^{+2} bağımlı fosfolipit bağlanan proteindir. PS’e karşı yüksek afinitesi bulunur ve açıkta PS bulunan hücreler ile bağlanır. Annexin V FITC ve PS, ya da

biotin ve işaretli arttırılmış yeşil floresans protein gibi florokromlar ile konjugat oluşturur. Bu yapı PS'e karşı yüksek afinitesini kaybeder ve bu sebeple apoptoza giden hücrelerin akış sitometrik analizi için duyarlı bir prob olarak hizmet eder. PS'ın dışsallaştırılmasının apoptozun erken safhalarında gerçekleşmesinden dolayı, Anneksin V boyaması, erken safha apoptozu olarak tanımlanabilir ve DNA fragmentleşmesi gibi çekirdekdeki değişiklik zamanına dayanır. Annexin V boyaması, membranın bütünlüğünü kaybetmesine yol açar ve bununla beraber apoptoz ya da nekrotik süreç ile son evrelerdeki hücre ölümlerine eşlik eder. Bu sebeple, propidium iodat (PI) ya da 7- amino-aktinomisin D (7-AAD) gibi boyalarla bağlanan Annexin V ile boyama işlemi, erken apoptotik hücreler ile ölü ya da apoptozun son safhasındaki hücreler ayırt edilmesine yardımcı olur.

Flow sitometri analizleri (Beckman Coulter Navios Ex, Clare, Ireland) cihazında ve hazır ticari kit (Beckman Coulter, Cat. No: IM3614) kullanılarak aşağıdaki protokol takip edilerek gerçekleştirildi.

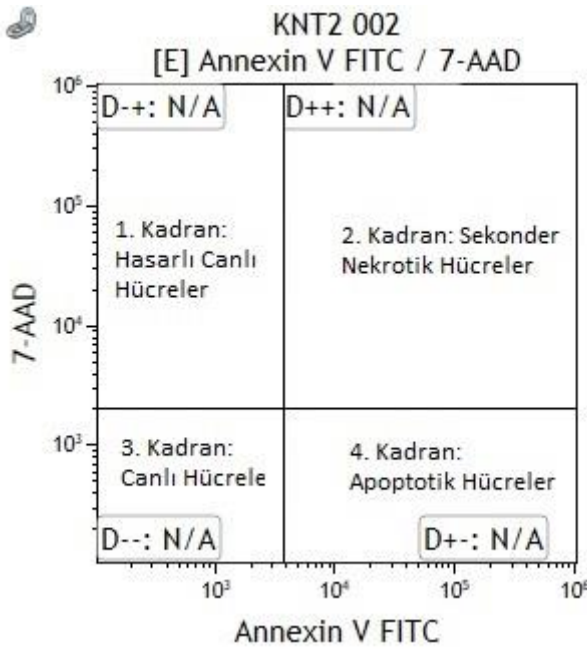
1. Her bir grup için hücreler 75 cm²'lik steril hücre kültür flasklarına 2,1x10⁶ hücre olacak şekilde ekildiler. Hücreler flask tabanının %70-80'nini kapladığında her bir grup için ajanlar o gruba ait flasklara IC₅₀ dozlarında uygulandı.
2. Hiçbir kimyasal uygulaması yapılmayan flaskların birinden toplanan yaklaşık 8,8x 10⁶ hücre pozitif kontrol yapılmak üzere tripsin EDTA uygulaması ile flask tabanından kaldırılıp 15ml'lik steril falcon tüpe alındı. Bu hücreler apoptozu tetiklemek maksadıyla buz üzerinde 30 dakika boyunca %3'lük formaldehit içeren PBS ile mualeme edildi. Bu grup hücreler Annexin V boyamasının doğrulanması için analiz edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Pozitif kontrol grubunda Annexin V sinyali.

- 24 saatlik uygulama süresi sonunda ajan içeren besiyerleri flasklardan uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin EDTA uygulaması ile flask tabanından kaldırılıp, buz gibi PBS ile yıkanıp 15 ml'lik falcon tüplere toplandı.
- Her bir gruba ait falcon tüpler önceden soğutulmuş +4 °C'deki santrifüj kullanılarak 500g'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi.
- Süpernatant atıldı ve hücre peleti buz gibi soğuk 1X Binding Buffer ile mililitresinde 8×10^6 hücre olacak şekilde yeniden süspanse edildi (Bu işlemlerin tamamı buz üzerinde yapıldı).
- Adım 5'de elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp bunun üzerine 10 µl Annexin A5-FITC solüsyonu ve 20 µl 7-AAD Viability Dye eklenip nazikçe karıştırıldı.
- Tüpler bu halde buz üzerinde karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. ,
- Son aşamada 400 µl buz gibi soğuk 1X Binding Buffer eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
- Flow sitometri cihazında hazırlanmış olan hücre süspansiyonları 30 dakika içinde analiz edildi.
- Flow sitometri analizinde her bir gruptan en az 20.000 hücre saydırıldı ve sonuçlar

değerlendirilirken sayılan hücreler 4 farklı kadranda ele alındı. Buna göre düşük 7-AAD ve düşük FITC gösteren 3. kadrantdaki hücreler canlı hücreler, düşük 7-AAD ve yüksek FITC gösteren 4. kadrantdaki hücreler erken apoptotik hücreler, yüksek 7-AAD ve yüksek FITC gösteren 2. kadrantdaki hücreler sekonder nekrotik hücreler ve son olarak yüksek 7-AAD ve düşük FITC gösteren hücreler ise hasarlı canlı hücreler olarak değerlendirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Flow sitometrik analizin yorumlanması

3.13. Western Blot Analizi

3.13.1. Western blot analizi için protein izolasyonu

Western blot analizi için total protein izolasyonu hazır ticari kit kullanılarak (GeneAll ProteinEx, Cat. No: 701-001) aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Her bir grup için hücreler 75 cm²'lik steril hücre kültür flasklarına 2,1x10⁶ hücre olacak şekilde ekildiler. Hücreler flask tabanının %70-80'nini kapladığında her bir grup için ajanlar o gruba ait flasklara IC₅₀ dozlarında uygulandı.
2. Protokole başlamadan önce her 50 ml ProteinEx lizis solüsyonuna 1 proteaz inhibitör

kokteyl tableti (Roche Complete, Cat. No: 11 697 498 001) eklendi.

3. 24 saatlik uygulama süresi sonunda ajan içeren besiyerleri flasklardan uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin EDTA uygulaması ile flask tabanından kaldırılıp önceden soğutulmuş santrifüj içerisinde 2500g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp hücreler 10 ml soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve fenol kırmızısı ve diğer reaktiflerden ari hale getirildi.
4. Yıkama işlemi neticesinde elde edilen hücre peleti üzerine 100 µl ProteinEx solüsyonundan eklendi ve buz üzerinde nazıkçe pipetaj yapılarak pellet haldeki hücreler süspansiyon haline getirildi ve 2 ml'lik ependorf godelere alındı.
5. Ependorf gode içerisine alınan hücre süspansiyonunun üzerine 900 µl daha ProteinEx solüsyonundan eklenerek buz üzerinde nazıkçe pipetaj yapıldı.
6. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda parçalanmamış hücreler, zar parçacıkları vs gidermek için ependorf gödenin kapağı sıkıca kapatılıp önceden soğutulmuş santrifüjde 16.000 g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant saklanmak üzere steril yeni ependorf godelere alındı.
8. Elde edilen total protein izolatu yukarıda belirtildiği şekli ile TaKaRa BCA Protein Assay Kiti kullanılarak total protein miktarları hesaplandı.

3.13.2. Western blot analizinde kullanılan kimyasalların hazırlanışı

1. 1X Phosphate Buffered Saline, %0,1 Tween 20 (1X PBST) Hazırlanışı (Son Hacim 200ml)
 - Önce 10X PBS hazırlandı. Bunun için normalde 200 ml'de çözünen 1 adet PBS tablet (Sigma, Cat. No: P4417-100TAB) 20 ml'de bir süre manyetik karıştırıcıda tutularak çözüldü.
 - 20 ml 10XPBS, 179,8 ml dH₂O ve 0,2 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, Cas-No: 9005-64-5) karıştırılarak toplanda 200 ml PBST hazırlandı.
2. %5'lik Non Fat Dry Milk Powder (NFDM) Solüsyonu Hazırlanışı
 - 10 g NFDM Powder tartılıp 200 ml PBST içinde çözüldü ve böylelikle 200

ml %5 lik NFDm PBST hazırlandı.

3. 1X MES Running Buffer Hazırlanışı

- 10X MES Running Buffer (Biolegend, Cat. No: 426307)'dan 100 ml alıp 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

3.13.3. Western blot analizi için protein örneklerinin denatüre edilmesi

1. Protein izolatu üzerine 5X SDS PAGE Sample Loading Buffer (ABP Biosciences, Cat. No: P013), 10X Sample Reducing Agent (Novex Bolt, Ref: B0009) ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde su eklendi.
2. Adım 1'deki şekilde hazırlanan 20 µl'lik karışımın içerisinde her bir örnek için 30 µg total protein ekstartkı olması sağlandı.
3. Adım 1'de hazırlanan karışım konvansiyonel PCR cihazı (BIORAD T100 Thermal Cycler) kullanılarak 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve hemen ardından cihazın +4 °C'ye hızlıca inmesi sağlanarak yüksek sıcaklıkta denatüre olan proteinlerin tekrar renatüre olmaması sağlandı.

3.13.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS PAGE elektroforez

1. Dikey elektroforez sistemi (Invitrogen Novex Mini-Cell) kendi tankı içerisinde yerleştirildi.
2. %4-12'lik Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen NuPAGE 4-12% Bis Tris Gel, Cat. No: NP0323BOX) dikey elektroforez sisteminin jel tutucu klepsleri arasına sıkıştırıldı ve dikkatlice jel tarakları yerlerinden çıkarıldı.
3. Önceden hazırlanmış ve +4 °C'de soğutulmuş olan 1X MES Buffer elektroforez tankına döküldü ve tankın kasetleri arasından sızıp sızmadığı kontrol edildi (Bu aşamada sızdırma olursa elektrik akımı verildikten sonra güç kaynağında voltaj dalgalanmaları yaşandığı ve bantların yamuk ilerlediği ön denemelerde tespit edildi).
4. Sızdırmazlık testinden sonra iki jel kasetinin ortasında kalen tankın core bölümüne 200 ml tankın core dışı bölgesine ise 600 ml soğuk 1X MES Buffer döküldü.
5. Tankın core bölgesine dökülen 200 ml'lik 1X MES Buffer içerisinde 500 µl NuPAGE™ Antioxidant eklendi ve homojen karışımı sağlandı.

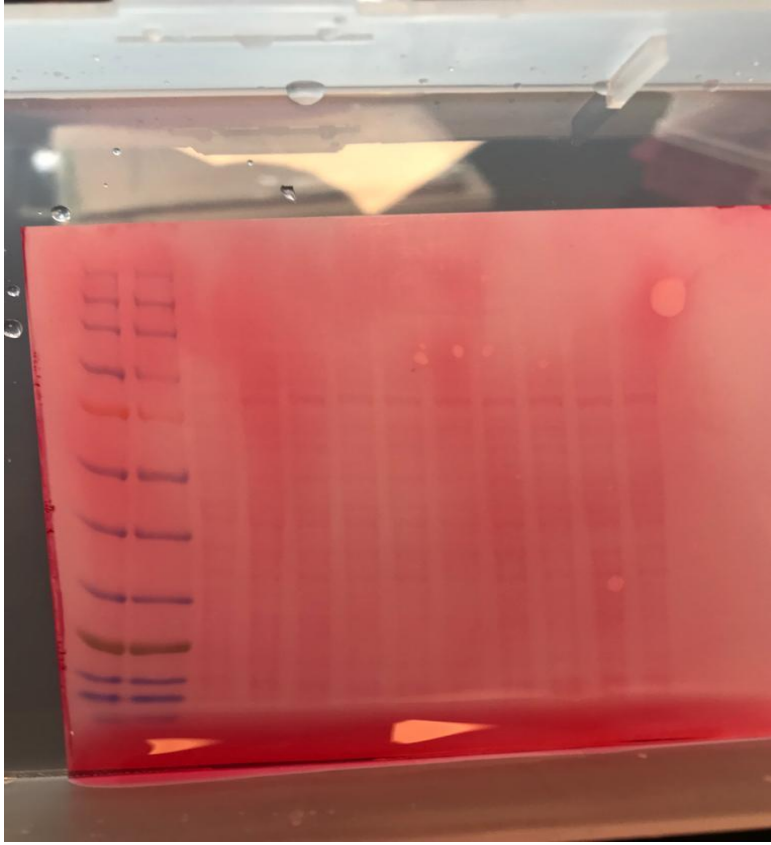
6. Protein örnekleri jeldeki kuyucuklara yüklenmeden önce 200 µl'lik bir otomatik pipete 1X MES Bufferdan çekilerek kuyucuklar hava kabarcığı kalmasına müsaade edilmeyecek şekilde yıkandı.
7. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en baştakine ve tekrar jelinin de orta kuyucuğuna dublike şekilde 5 µl protein ladder (BLUeye Prestained Protein Ladder, Cat. No: PM007-0500) yükleme yapıldı.
8. Diğer kuyucuklara ise yukarıda hazırlanışı verilen denatüre protein örneklerinden 20 µl yüklendi (Her bir grubun her bir örneğinden dublike çalışıldı).
9. Dikey elektroforez sisteminde kırmızı kırmızıya ve siyah siyaha olacak şekilde güç kaynağı bağlantı elektrotları takıldı ve elektroforez tankının hazır olduğundan emin olundu.
10. Güç kaynağından elektrik akımı verildiğinde tankın içerisinde oluşan hava kabarcıkları gözle kontrol edildi.
11. Elektroforez sisteminden 5 dakika 180 volt ve ardından 120 volt elektrik akımı geçirildi. Protein örneklerinin jelin diğer tarafından çıkışına izin vermeden ve protein ladderın tamamen açıldığından emin olunduktan sonra 120 voltluk akım da tamamen kesildi.

3.13.5. Blotlama

1. Dikey elektroforez sisteminde proteinler yürütüldükten sonra elektrot kabloları güç kaynağından çıkarıldı ve tankın kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı gevşetildikten sonra jel kaseti tankın içerisinden çıkarıldı.
2. Jel kaseti, jel bıçağı (Gel Knife Each, Thermo: EI9010) yardımı ile kenarlarındaki boşlukların ayrılması ile açıldı.
3. Jelin tarak kısımları ve jel kasetinin bitim bölgesinde yer alan görece daha kalın olan jel bölgeleri jel bıçağı ile kesilerek jelden uzaklaştırıldı.
4. Kasetinden kurtarılıp fazlalık bölgeleri kesilen jel kırılmasına ve kurummasına müsaade edilmeden dikkatlice dH₂O içerisine alındı.
5. SDS PAGE jeli üzerindeki proteinlerin nitrosülülöz membranı transferi işleminde (blotlama) iBLOT2 Gel Transfer Sistemi (Invitrogen Blot2 NC Regular Stack, Ref. No: IB23001) kullanıldı.
6. BLOT2 stackları tek kullanımlık paketleri halinde yer almaktaydı. Her bir paketin içerisinde ise anot ve katot stackları birbirlerinin üstüne konulmuş şekilde

bulunmaktaydı. Anot stack içene oturdulduğu plastik kısımla beraber iBLOT2 Jel Transfer Sistemine yerleştirildi.

7. Sisteme yerleştirilen anot stack üzerine çok dikkatli bir şekilde SDS PAGE jeli yerleştirildi. Bu işlemde hemen sonra jel ve anot stack arasında hava kabarcığı kalmaması için western blot roller (Thermo, Cat. No: 84747) ile jel ve anot stack üzerinden nazikçe birkaç kez geçildi.
8. Jelin üzerine hızlıca kit içerisinde yer alan filtre kâğıdı dH₂O ile ıslatıldıktan sonra yerleştirildi ve yine hava kabarcıklarından kurtulmak için roller ile nazikçe üzerinden birkaç kez geçildi.
9. Katot stack plastiğinden uzaklaştırıldı ve bakır yüzey yukarı jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdında bakacak şekilde filtre kâğıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi ve yine roller kullanılarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
10. Tüm hepsinin üzerine en son alimünyum uzantıları olan sünger yerleştirildi. Alimünyum uzantıların iBLOT2 cihazının metal elektrotları ile aynı hizada yer aldığı görsel olarak doğrulandı.
11. iBLOT2 cihazının kapağı dikkatli bir şekilde kapatıldı. Cihazın dijital dokunmatik ekranından P3 programı seçildi ve 7 dakika içerisinde transfer işlemi tamamlandı.
12. Transfer işlemi sonrasında SDS PAGE jeli üzerinde yer alan marker bantlarının nitroselüloz membrana geçtiği gözlemlendi ve nitroselüloz membran anot ve katot stacklar arasından çıkarılarak içerisinde dH₂O olan kabın içerisine alındı.
13. Blotlama işlemi sonrası bloklama ve antikor muamelesine geçmeden önce nitrosülüz membran üzerindeki örneklere ait muhtemel protein bantlarının gözlemlenebilmesi için protein bantları Ponceau S Staining Solution (Thermo Scientific, Cat. No: A40000279) kullanılarak gözle görülür hale getirildi ve protein bantlarının birbirinden ayrıştığından emin olundu (Resim 3.1).



Resim 3.1. Ponceau S Staining Solüsyonu ile görünür hale getirilen protein bantları

3.13.6. Bloklama

1. Bloklama işleminde kullanılmak üzere %5 NFDM-PBST solüsyonu yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandı.
2. iBLOT2 sisteminden çıkarılan nitroselüloz membran içerisinde 10 ml %5 NFDM-PBST (Bloklama Solüsyonu) olan temiz bir kaba alındı.
3. İçerisinde nitroselüloz membranın olduğu bu kap çalkalayıcı üzerinde hafif hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

3.13.7. Primer antikor uygulaması

1. Kullanılan antikor ve sulandırma oranları aşağıdaki çizelgede verildiği şekliyle yapıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Western blotda kullanılan primer antikorlar ve sulandırma oranları

Marka	Cat. No.	Host	Antikor Adı	Moleküler Ağırlığı	Sulandırma Oranı
BT Lab.	BT-AP09788	Rabbit	Beta Actin Antibody	41,73 kDa	1:3000
FineTest	FNab00662	Rabbit	Anti-ATF-4 Antibody	50-58 kDa	1:500
FineTest	FNab05613	Rabbit	Anti-NDUFA9	39 kDa	1:500
FineTest	FNab01667	Rabbit	Anti-CHOP Antibody	30 kDa	1:500

2. Tabloda bilgileri verilen primer antikorlar bloklama solüsyonu (%5 NFDM-PBST) kullanılarak belirtilen oranlarda sulandırıldı.
3. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membran 10 ml dilüe edilmiş primer antikor içerisinde bir gece +4 °C’de inkübe edildi.
4. Ertesi gün +4 °C’den çıkarılan membranlar primer antikor solüsyonundan henüz çıkarılmadan çalkalayıcı üzerinde hafif çalkalamada oda sıcaklığında 2 saat daha inkübe edildi.

3.13.8. Yıkama

1. Primer antikor inkübasyonu bittikten sonra primer antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı.
2. Daha sonra nitroselüloz membran PBST içerisinde 3 kez 5’er dakika boyunca shaker üzerinde hafif çalkalama altında yıkandı.

3.13.9. Sekonder antikor uygulanması

1. Bilgileri aşağıdaki çizelgede verilen sekonder antikor (Çizelge 3.3) bloklama solüsyonu kullanılarak (%5 NFDM-PBST) üreticinin talimatları doğrultusunda sulandırıldı.
2. Tabloda da verilen şekliyle 10.000 kat sulandırma yapmak için 1 µl sekonder antikor üzerine 9.999 µl %5 NFDM-PBST eklendi.
3. Yıkama işlemi 2. adımda kullanılan yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra sulandırılan sekonder antikordan 10 ml nitrosülüz membran üzerine uygulandı ve 1 saat oda sıcaklığında hafif çalkalama modunda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Çizelge 3.3. Western blotda kullanılan sekonder antikor ve sulandırma oranı

Marka	Cat. No.	Antikor Adı	Sulandırma Oranı
BT Lab	BT-AS00010	Goat-Anti Rabbit IgG/HRP	1:10000

3.13.10. İkinci yıkama

1. Sekonder antikor inkübasyonu bittikten sonra sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı.
2. Daha sonra nitroselüloz membran PBST içerisinde 3 kez 5'er dakika boyunca shaker üzerinde hafif çalkalama altında yıkandı.

3.13.11. Görüntüleme ve bantların analizi

1. Yıkama işlemi bittikten sonra membranlar 6 ml ECL Solüsyonu (Advansta WesternBright ECL, Cat. No: K-12045-D50) içerisine alınarak görüntüleme cihazına (ChemiDoc-It², UVP) yerleştirildi.
2. ECL Substratı içerisinde bir dakikalık inkübasyonun ardından görüntü alındı.
3. ChemiDoc-It kemilüminesans görüntüleyiciden alınan görüntülerdeki bantların görüntü analizi ile plot grafiklerinin eldesi ve bant genişlik ve yoğunluğunun rakamsal analizi İmage J programı kullanılarak yapıldı.

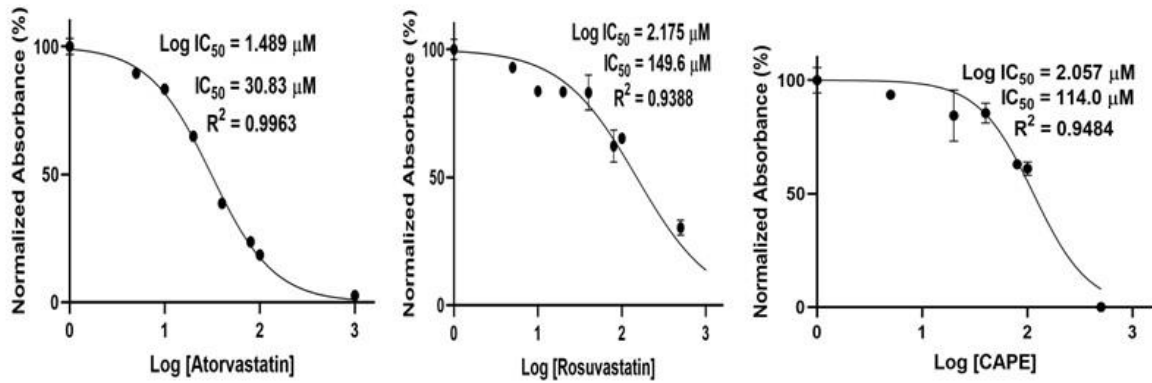
3.14. İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılım gösterip göstermedikleri analiz edildi. Veriler normal dağılım gösterdiği için üç ya da daha fazla grubun kıyası maksadıyla parametrik testlerden One Way ANOVA testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesi için Dunnett's korelasyon analizleri yapıldı. $P<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Belirlenen IC₅₀ Dozları

MTT analizi neticesinde Atorvastatin IC₅₀ dozu 30,83 μ M, Rosuvastatin IC₅₀ dozu 149,6 μ M ve CAPE IC₅₀ dozu 114 μ M olarak tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Atorvastatin, Rosuvastatin ve CAPE'in IC₅₀ dozları.

4.2. TAC, TOC VE OSI Bulguları

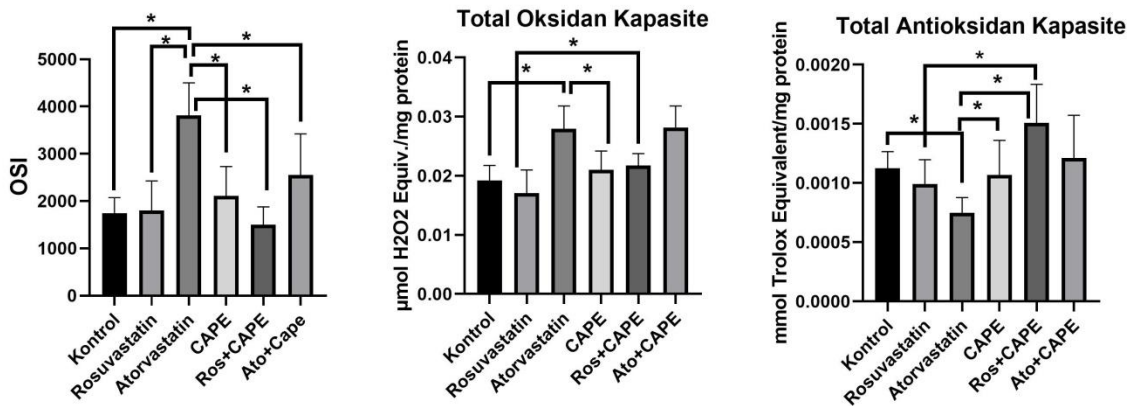
Atorvastatin uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02796 μ mol H₂O₂ Equiv./mg protein olarak bulunurken total antioksidan kapasite 0,000748 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak tespit edilip, oksidatif stress indeksi 3814 olarak hesaplanmıştır. Atorvastatinle beraber CAPE uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02818 μ mol H₂O₂ Equiv./mg protein olarak tespit edilmişken antioksidan kapasite 0,001211 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak bulunmuş olup oksidatif stress indeksi 2551 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Total Oxidant Capacity (TOC) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein), Total Antioxidant Capacity (TAC) (mmol Trolox Equivalent/mg protein), Oxidative Stress Index (OSI) düzeyleri.

		Kontrol	Rosuvastatin	Atorvastatin	CAPE	Ros+CAPE	Ato+Cape
TOC	Ortalama	0,01923 ^a	0,01704 ^a	0,02796 ^b	0,02103 ^a	0,02172 ^c	0,02818 ^d
	Standart Hata	0,002518	0,003939	0,003867	0,003160	0,002016	0,003643
TAC	Ortalama	0,001124 ^a	0,000993 ^a	0,000748 ^b	0,001068 ^a	0,00151 ^c	0,001211 ^a
	Standart Hata	0,000142	0,000205	0,0001288	0,0002937	0,0003248	0,0003618
OSI	Ortalama	1739 ^a	1797 ^a	3814 ^b	2109 ^a	1502 ^a	2551 ^d
	Standart Hata	335,2	629,5	686,8	622,9	376,1	872,6

Farklı üssü ifadelere sahip gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmaktadır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Rosuvastatin uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,01704 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak bulunurken total antioksidan kapasite 0,000993 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak tespit edilip, oksidatif stress indeksi 1797 olarak hesaplanmıştır. Rosuvastatinle beraber CAPE uygulanan grupta total oksidan kapasite 0,02172 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein olarak tespit edilmişken antioksidan kapasite 0,00151 mmol Trolox Equiv./mg protein olarak bulunmuş olup oksidatif stress indeksi 1502 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.2. TOC, TAC ve OSI düzeylerinin karşılaştırılması. (* $p < 0,05$)

Çizelge 4.2. Kontrol grubuna kıyasla gruplar arasındaki Total Oxidant Capacity (TOC), Total Antioxidant Capacity (TAC), Oxidative Stress Index (OSI) düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması.

	Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95,00 Güven Aralığı	Kısaltma	P değeri
TOC ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/mg prot)	Kontrol vs. Rosuvastatin	0,002197	-0,0007606 to 0,005154	ns	0,1749
	Kontrol vs. Atorvastatin	-0,008729	-0,01254 to - 0,004916	****	<0,0001
	Kontrol vs. CAPE	-0,001795	-0,003819 to 0,0002294	ns	0,0911
	Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,002488	-0,004476 to - 0,0005006	*	0,0141
	Kontrol vs. Ato+CAPE	-0,008949	-0,01217 to - 0,005729	****	<0,0001
	Rosuvastatin vs. Atorvastatin	-0,01093	-0,01468 to - 0,007173	****	<0,0001
	Rosuvastatin vs. CAPE	-0,003992	-0,007634 to - 0,0003493	*	0,0233
	Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	-0,004685	-0,008579 to - 0,0007911	**	0,0092
	Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	-0,01115	-0,01479 to - 0,007503	****	<0,0001
	Atorvastatin vs. CAPE	0,006934	0,003443 to 0,01042	****	<0,0001
	Atorvastatin vs. Ros+CAPE	0,006241	0,002488 to 0,009993	****	<0,0001
	Atorvastatin vs. Ato+CAPE	-0,0002203	-0,003711 to 0,003270	****	<0,0001
	CAPE vs. Ros+CAPE	-0,0006933	-0,004336 to 0,002949	*	0,0233
	CAPE vs. Ato+CAPE	-0,007154	-0,01053 to - 0,003782	**	0,0092

	Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	-0,006461	-0,01010 to - 0,002818	****	<0,0001
TAC (mmol Trolox Equivalent/mg protein)	Kontrol vs. Rosuvastatin	0,0001311	-0,0001453 to 0,0004076	ns	0,5305
	Kontrol vs. Atorvastatin	0,0003758	0,0002453 to 0,0005063	****	<0,0001
	Kontrol vs. CAPE	0,00005637	-0,0001679 to 0,0002807	ns	0,9292
	Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,0003858	-0,0005959 to - 0,0001758	***	0,0009
	Kontrol vs. Ato+CAPE	-0,00008747	-0,0003766 to 0,0002017	ns	0,8658
	Rosuvastatin vs. Atorvastatin	0,0002446	-5,375e-005 to 0,0005430	ns	0,1708
	Rosuvastatin vs. CAPE	-7,477e-005	-0,0003644 to 0,0002149	ns	0,9743
	Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	-0,0005170	-0,0008266 to - 0,0002073	****	<0,0001
	Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	-0,0002186	-0,0005083 to 7,104e-005	ns	0,2476
	Atorvastatin vs. CAPE	-0,0003194	-0,0005970 to - 4,183e-005	*	0,0147
	Atorvastatin vs. Ros+CAPE	-0,0007616	-0,001060 to - 0,0004632	****	<0,0001
	Atorvastatin vs. Ato+CAPE	-0,0004633	-0,0007408 to - 0,0001857	****	<0,0001
	CAPE vs. Ros+CAPE	-0,0004422	-0,0007318 to - 0,0001525	***	0,0004
	CAPE vs. Ato+CAPE	-0,0001438	-0,0004120 to 0,0001243	ns	0,6229
	Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	0,0002983	8,691e-006 to 0,0005880	*	0,0397
OSI	Kontrol vs. Rosuvastatin	-57,65	-789,4 to 674,1	ns	0,9997

Kontrol vs. Atorvastatin	-2075	-2647 to -1502	****	<0,0001
Kontrol vs. CAPE	-369,6	-892,9 to 153,7	ns	0,2549
Kontrol vs. Ros+CAPE	237,6	-39,69 to 514,9	ns	0,1082
Kontrol vs. Ato+CAPE	-811,5	-1561 to -62,04	*	0,0302
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	-2017	-2692 to -1341	****	<0,0001
Rosuvastatin vs. CAPE	-312	-1143 to 519,5	ns	0,7899
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	295,3	-447,2 to 1038	ns	0,7503
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	-753,9	-1652 to 144,0	ns	0,1186
Atorvastatin vs. CAPE	1705	945,7 to 2464	****	<0,0001
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	2312	1618 to 3007	****	<0,0001
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	1263	544,0 to 1982	***	0,0007
CAPE vs. Ros+CAPE	607,2	1,893 to 1213	*	0,0492
CAPE vs. Ato+CAPE	-441,9	-1109 to 225,6	ns	0,3146
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	-1049	-1855 to -243,3	**	0,0096

P<0,05 istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir. * üssü ifadenin sayısı p değerinin küçüklüğü ile orantılıdır.

Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde TOC değerleri bakımından; Rosuvastatin (p: 0,1749) ve CAPE (p: 0,0911) grupları kontrol grubuna benzer bulunmuş fakat Atorvastatin (p<0,0001), Ato+CAPE (p<0,0001) ve Ros+CAPE (p:0,0141) grupları kontrol grubuna kıyasla arttığı bulunmuştur.

TAC değerlerine bakıldığında ise Rosuvastatin (p: 0,5305), CAPE (p: 0,9292) ve Ato+CAPE (p: 0,8658) grupları ile kontrol grubu arasında istatistiki bir farklılık gözlemlenmemiş fakat Atorvastatin (p<0,0001) grubunda kontrol grubuna nazaran düşüş Ros+CAPE (p: 0,0009) grubunda ise yükseldiği tespit edilmiştir.

TAC ve TOC analizlerinden elde edilen rakamlar kullanılarak hesaplanan OSI bulguları bakımından ise Atorvastatin (p<0,0001) ve Ato+CAPE (p: 0,0302) grupları kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Fakat Atorvastatin ve Ato+CAPE gruplarını kendi arasında kıyasladığımızda ise Ato+CAPE grubunda Atorvastatin grubuna nazaran OSI değerleri açısından istatistiki anlamı olacak şekilde bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (p: 0,0007). Ayrıca OSI değerleri bakımından Rosuvastatin (p: 0,9997), CAPE (p: 0,2549) ve Ros+CAPE (p: 0,1082) gruplarının kontrol grubuna kıyasla istatistiki farklılık göstermediği gözlemlenmiştir.

4.3. Real Time PCR Bulguları

Real Time PCR analizi neticesinde ATF4 ve CHOP genlerine ait mRNA ekspresyon düzeylerinin gruplar arasındaki kıyaslaması çizelge (çizelge 4.3, çizelge 4.4) ve box plot grafikleri (şekil 4.3, şekil 4.4) verilmiştir. Buna göre ATF4 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla rosuvastatin, atorvastatin ve CAPE gruplarında sırasıyla 0,516 (p: 0,009); 0,361 (p:0,003) ve 0,328 (p:0,001) kat azalmış olarak bulundu. ATF4 mRNA ekspresyon düzeyleri Ros+CAPE ve Ato+CAPE gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,355 kat artmış (p:0,305) ve 0,859 kat baskılanmış (p:0,61) olarak gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Kontrol grubuna kıyasla ATF4 geni mRNA ekspresyon düzeyleri

ATF4	Ekspresyon	Standart Hata	%95 güven aralığı	p değeri	Sonuç
Rosuvastatin	0,516	0,279 - 0,808	0,210 - 0,957	0,009	Baskılanma
Atorvastatin	0,361	0,204 - 0,589	0,140 - 0,698	0,003	Baskılanma
Ros+CAPE	1,355	0,692 - 2,315	0,469 - 3,748	0,305	Benzer
Ato+CAPE	0,859	0,459 - 1,400	0,354 - 1,576	0,61	Benzer
CAPE	0,328	0,183 - 0,527	0,131 - 0,631	0,001	Baskılanma

P<0,05 istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

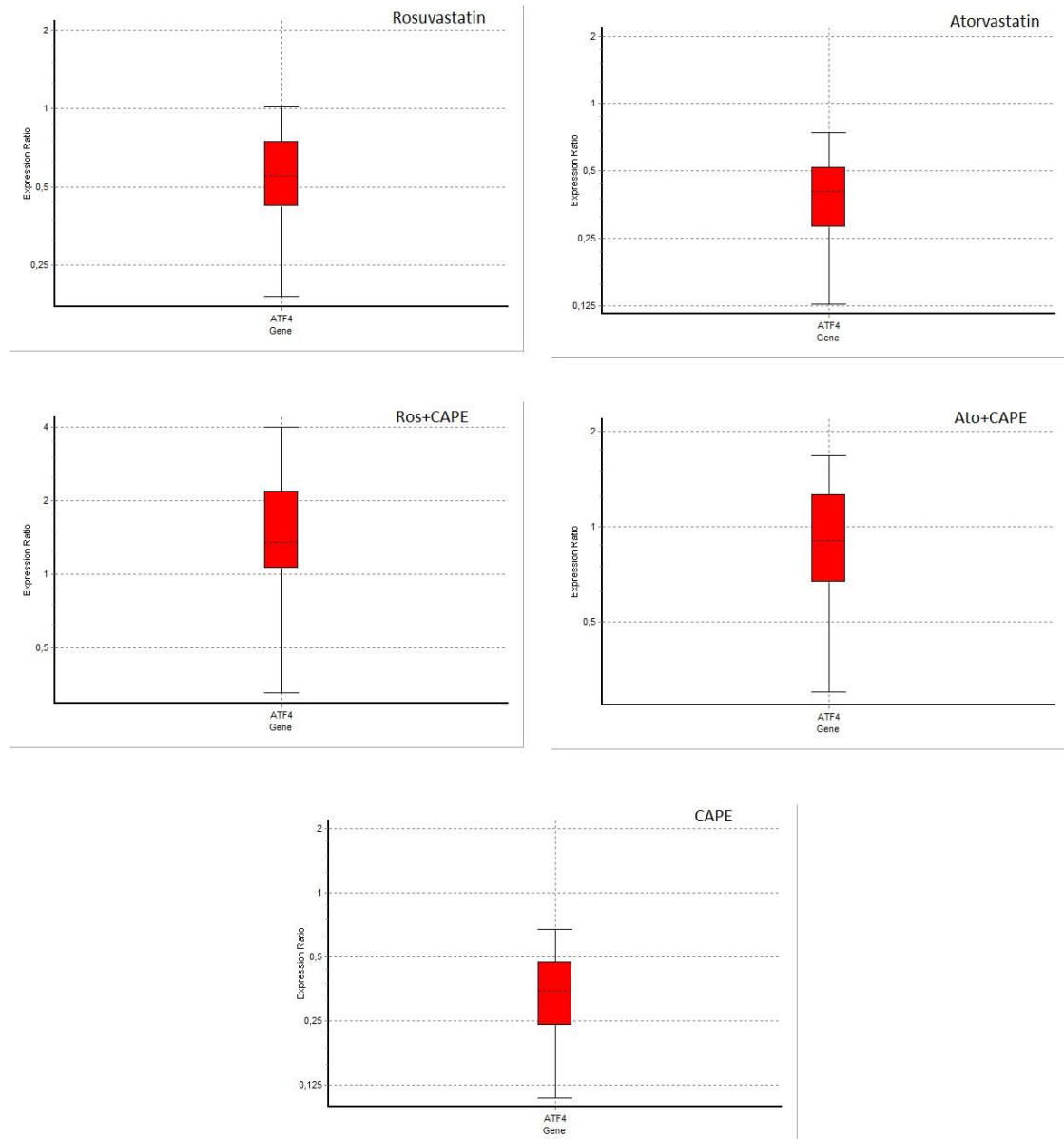
CHOP genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla Ros+CAPE, Ato+CAPE ve CAPE gruplarında sırasıyla 1,408 (p:0,02); 1,825 (p:0,008) ve 1,349

(p:0,007) kat artmış olarak bulunmuştur. CHOP geni mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin ve Atorvastatin gruplarında ise sırasıyla 1,269 kat artmış (p:0,136) ve 0,981 (0,873) kat baskılanmış olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

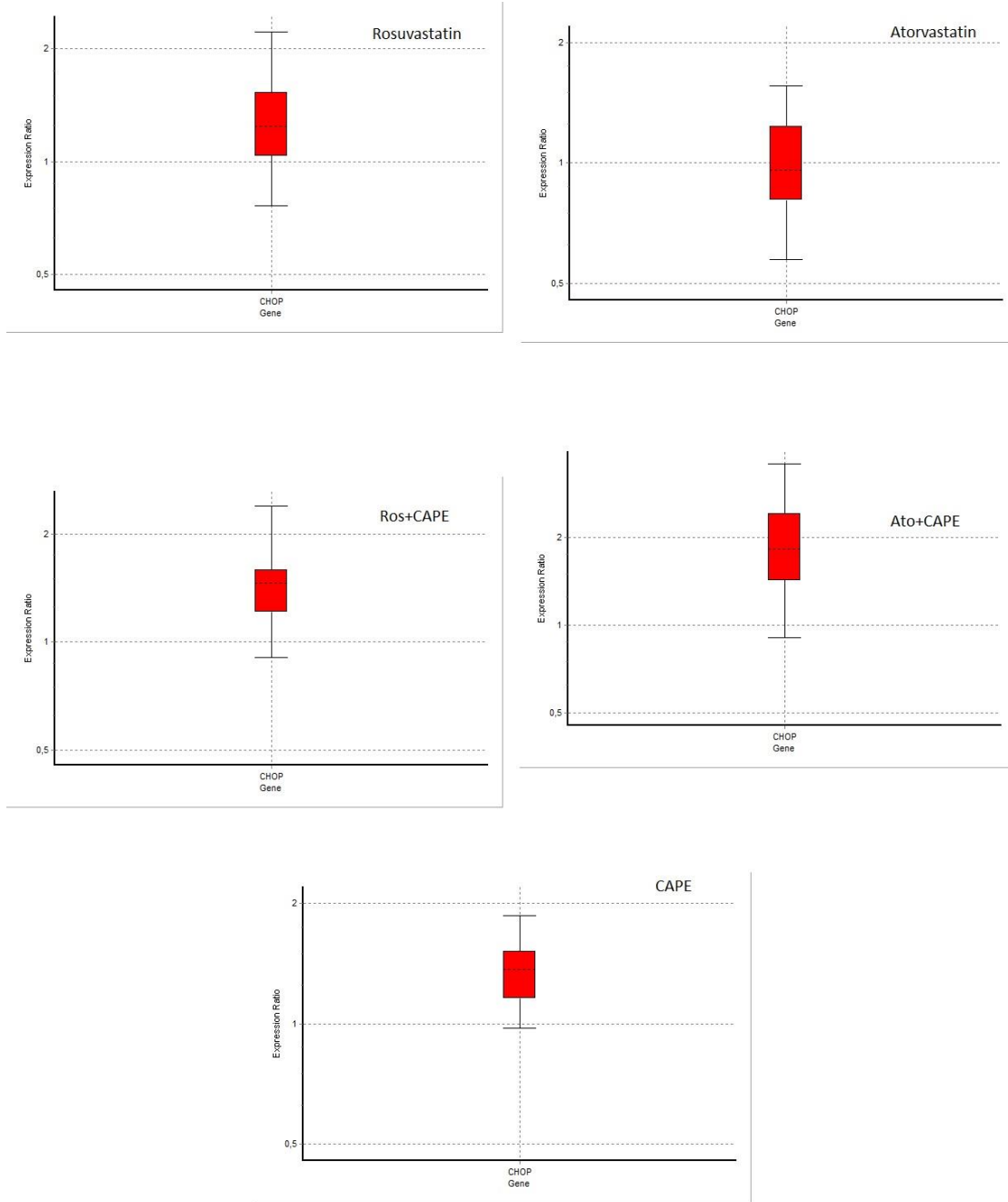
Çizelge 4.4. Kontrol grubuna kıyasla CHOP geni mRNA ekspresyon düzeyleri

CHOP	Ekspresyon	Standart Hata	%95 güven aralığı	p değeri	Sonuç
Rosuvastatin	1,269	0,939 - 1,737	0,828 - 2,079	0,136	Benzer
Atorvastatin	0,981	0,762 - 1,283	0,623 - 1,539	0,873	Benzer
Ros+CAPE	1,408	1,102 - 1,790	0,955 - 2,200	0,02	Uyarılma
Ato+CAPE	1,825	1,262 - 2,633	0,984 - 3,289	0,008	Uyarılma
CAPE	1,349	1,105 - 1,617	0,993 - 1,806	0,007	Uyarılma

P<0,05 istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.3. ATF4 geni mRNA ekspresyon seviyeleri



Şekil 4.4. CHOP geni mRNA ekspresyon seviyeleri

4.4. Flow Sitometri Bulguları

Flow sitometrik analizler neticesinde her bir deneysel grubun % apoptotik ve % nekrotik hücre içerikleri belirlenmiştir. Buna göre; kontrol grubu hücrelerin ortalama % 1’inde, Rosuvastatin uygulanan hücrelerin ortalama %7,275’inde, Ros+CAPE uygulanan hücrelerin ortalama %1,103’ünde, Atorvastatin uygulanan hücrelerin ortalama

%5,455’inde, Ato+CAPE uygulanan hücrelerin ortalama %0,532’sinde ve yalnız CAPE uygulanan hücrelerin ise ortalama %0,852’sinde erken dönem apoptotik hücreye rastlanmıştır (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin ($p<0,0001$) ve Atorvastatin ($p<0,0001$) gruplarında % apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Her iki statinin CAPE ile olan kombinasyonlarında ise hem Ros+CAPE hem de Ato+CAPE gruplarında, Rosuvastatin ve Atorvastatin gruplarına kıyasla % apoptotik hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7).

Kontrol grubu hücrelerin ortalama % 0,15’inde, Rosuvastatin uygulanan hücrelerin ortalama %2,48’inde, Ros+CAPE uygulanan hücrelerin ortalama %0,32’sinde, Atorvastatin uygulanan hücrelerin ortalama %0,99’unda, Ato+CAPE uygulanan hücrelerin ortalama %0,18’inde ve yalnız CAPE uygulanan hücrelerin ise ortalama %0,26’sında nekrotik hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin ($p<0,0001$) ve Atorvastatin ($p<0,0001$) gruplarında % nekrotik hücre sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Her iki statinin CAPE ile olan kombinasyonlarında ise hem Ros+CAPE hem de Ato+CAPE gruplarında, Rosuvastatin ve Atorvastatin gruplarına kıyasla % nekrotik hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7).

Çizelge 4.5. Erken apoptotik hücre yüzdelerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 güven aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	-6,273	-7,248 to -5,298	<0,0001
Kontrol vs. Atorvastatin	-4,453	-5,428 to -3,478	<0,0001
Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,1005	-1,075 to 0,8741	0,9995
Kontrol vs. Ato+CAPE	0,4695	-0,5051 to 1,444	0,6766
Kontrol vs. CAPE	0,1495	-0,8251 to 1,124	0,9967
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	1,82	0,8021 to 2,838	0,0001
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	6,173	5,155 to 7,190	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	6,743	5,725 to 7,760	<0,0001
Rosuvastatin vs. CAPE	6,423	5,405 to 7,440	<0,0001
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	4,353	3,335 to 5,370	<0,0001
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	4,923	3,905 to 5,940	<0,0001
Atorvastatin vs. CAPE	4,603	3,585 to 5,620	<0,0001
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	0,57	-0,4479 to 1,588	0,5285
Ros+CAPE vs. CAPE	0,25	-0,7679 to 1,268	0,9722
Ato+CAPE vs. CAPE	-0,32	-1,338 to 0,6979	0,9235

$p<0,05$ istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

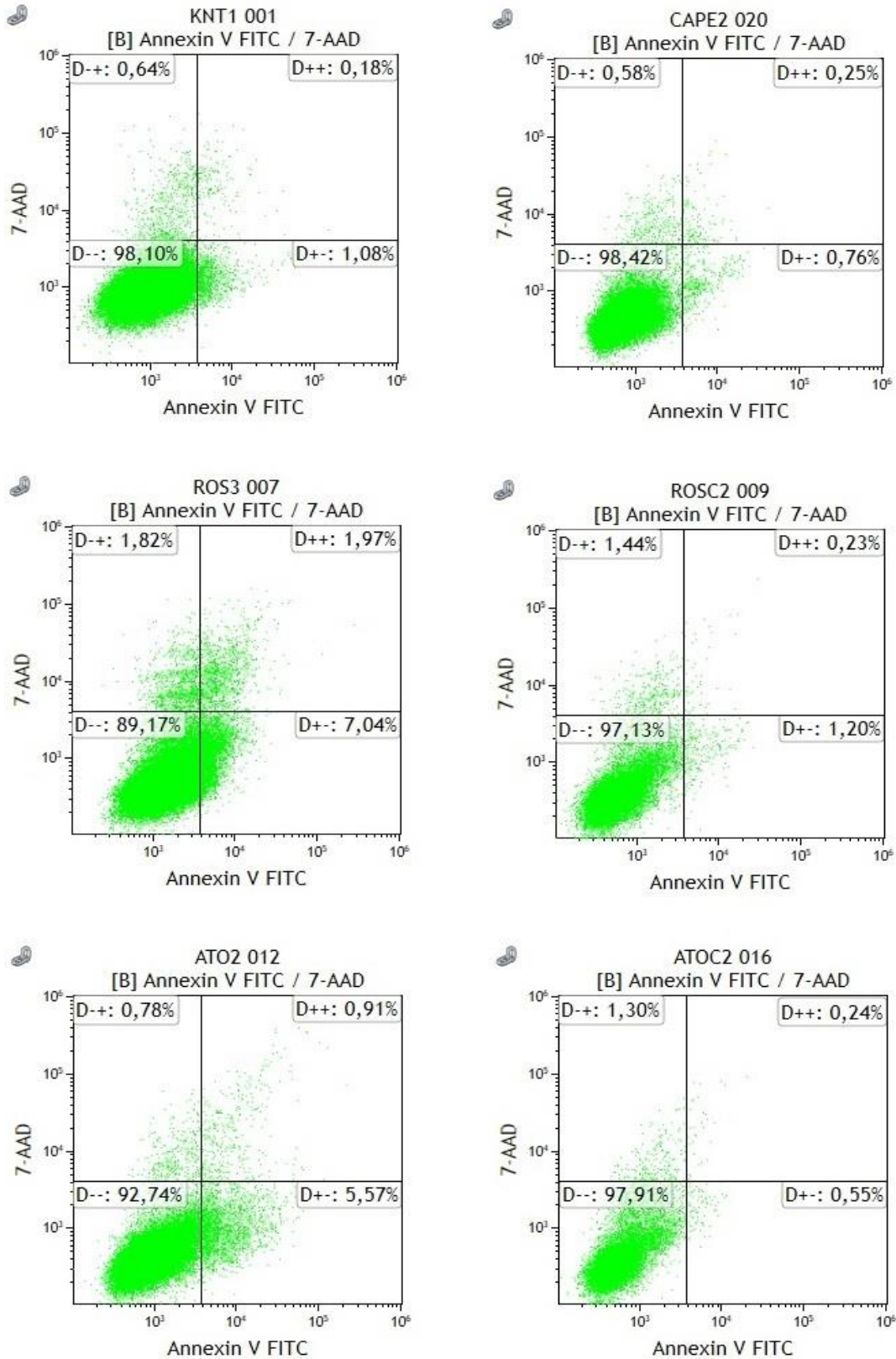
Çizelge 4.6. Nekrotik hücre yüzdelerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 güven aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	-2,333	-2,617 to -2,048	<0,0001
Kontrol vs. Atorvastatin	-0,8425	-1,127 to -0,5581	<0,0001
Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,17	-0,4544 to 0,1144	0,4558
Kontrol vs. Ato+CAPE	-0,0325	-0,3169 to 0,2519	0,9992
Kontrol vs. CAPE	-0,1175	-0,4019 to 0,1669	0,7939
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	1,49	1,206 to 1,774	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	2,163	1,878 to 2,447	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	2,3	2,016 to 2,584	<0,0001
Rosuvastatin vs. CAPE	2,215	1,931 to 2,499	<0,0001
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	0,6725	0,3881 to 0,9569	<0,0001
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	0,81	0,5256 to 1,094	<0,0001
Atorvastatin vs. CAPE	0,725	0,4406 to 1,009	<0,0001
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	0,1375	-0,1469 to 0,4219	0,6705
Ros+CAPE vs. CAPE	0,0525	-0,2319 to 0,3369	0,9921
Ato+CAPE vs. CAPE	-0,085	-0,3694 to 0,1994	0,9363

p<0,05 istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

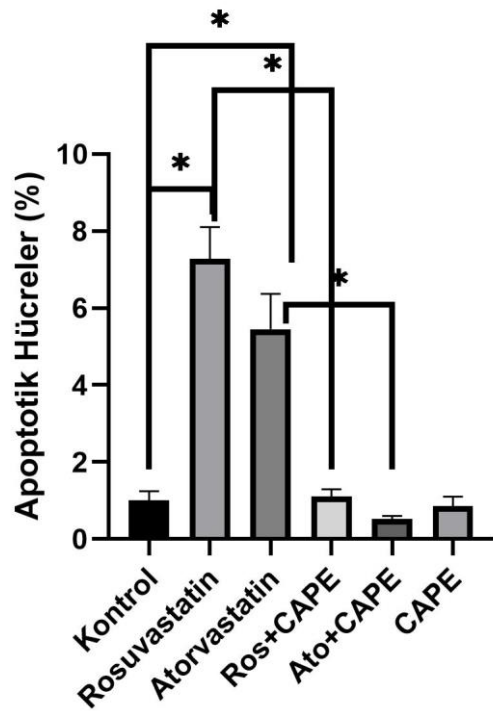
Çizelge 4.7. Grupların içerdiği apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri

Gruplar	Kontrol	Rosuvastatin	Atorvastatin	Ros+CAPE	Ato+CAPE	CAPE
Apoptotik Hücreler	1,002±0,24	7,275±0,83	5,455±0,913	1,103±0,19	0,532±0,073	0,852±0,249
Nekrotik Hücreler	0,15±0,02	2,48±0,24	0,99±0,14	0,32±0,2	0,18±0,04	0,26±0,05

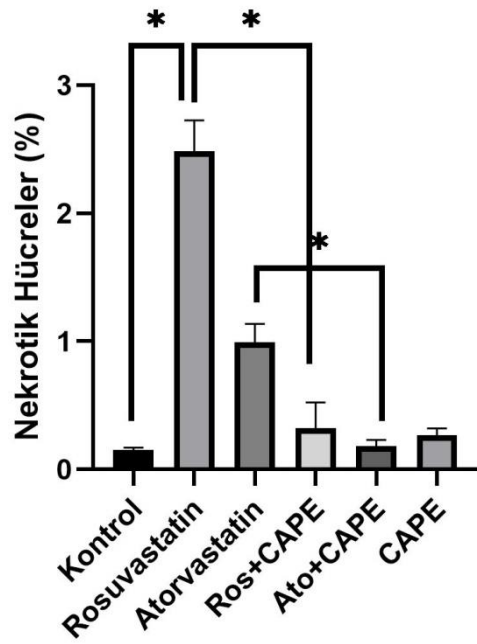


Şekil 4.5. Flow sitometrik analizde hücrelerin yüzdesel değerlendirilmesi

KNT: Kontrol, CAPE: Kafeik Asit Fenetil Ester, ROS: Rosuvastatin, ROSC: Rosuvastatin+CAPE, ATO: Atorvastatin, ATOC: Atorvastatin+CAPE



Şekil 4.6. % Apoptotik hücrelerin gruplar arası kıyası
(* $p < 0,05$)



Şekil 4.7. % Nekrotik hücrelerin gruplar arası kıyası
(* $p < 0,05$)

4.5. Western Blot Analiz Bulguları

Western Blot analizleri sonrasında her bir grup için protein miktarları gereç ve yöntemde belirtildiği şekliyle hesaplanmıştır. Her bir protein için elde edilen değer house keeping gen olarak kullanılan beta aktin çalışmasından elde edilen değerlere bölünerek normalize edilmiştir. Buna göre ATF4/beta aktin oranı Kontrol grubunda ortalama 1, Rosuvastatin grubunda ortalama 1,505, Atorvastatin grubunda ortalama 0,896, CAPE grubunda ortalama 0,884, Ros+CAPE grubunda ortalama 1,045, Ato+CAPE grubunda ortalama 1,046 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8 ve 4.9) (Şekil 4.8). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin grubunda ATF4 protein düzeylerinde artış olduğu ($p<0,0001$) gözlenmiş bu artışın CAPE uygulaması neticesinde Ros+CAPE grubunda Rosuvastatin grubuna kıyasla baskılandığı ($p<0,0001$) tespit edilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta ise ATF4 protein düzeyleri kontrol grubuna benzer ($p:0,6325$) bulunmuştur (Çizelge 4.8 ve 4.9). ATF4 protein düzeylerinin CAPE ($p: 0,5189$) ve Ato+CAPE ($p: 0,981$) gruplarında da kontrol grubuna benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.8. Grupların western blot bulguları

Gruplar	Kontrol	Rosuvastatin	Atorvastatin	CAPE	Ros+CAPE	Ato+CAPE
ATF4	1±0,126	1,505±0,253	0,896±0,058	0,884±0,013	1,045±0,012	1,046±0,055
CHOP	1±0,008	1,883±0,244	1,155±0,05	1,145±0,057	1,17±0,045	0,821±0,112
NDUFA9	1±0,03	1,132±0,007	1,097±0,018	1,011±0,096	1,04±0,072	0,984±0,04

CHOP/beta aktin oranı kontrol grubunda ortalama 1 bulunmuştur. Rosuvastatin grubunda ortalama 1,883 bulunurken Ros+CAPE grubunda ortalama 1,17 tespit edilmiştir. Atorvastatin grubunda ortalama 1,155 iken Ato+CAPE grubunda ortalama 0,821 olduğu ve CAPE grubunda ise ortalama 1,145 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10) (Şekil 4.9). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin grubunda CHOP protein düzeylerinde artış olduğu ($p<0,0001$) gözlenmiş bu artışın CAPE uygulaması neticesinde Ros+CAPE grubunda Rosuvastatin grubuna kıyasla baskılandığı ($p<0,0001$) tespit edilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta ise CHOP protein düzeyleri kontrol grubuna benzer ($p: 0,183$) bulunmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9). CHOP protein

düzeylerinin CAPE (p: 0,2376) ve Ato+CAPE (p: 0,0917) gruplarında da kontrol grubuna benzer olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9).

NDUFA9/beta aktin oranı Kontrol grubunda ortalama 1 bulundu. Rosuvastatin grubunda ortalama 1,132 bulunurken Ros+CAPE grubundan ortalama 1,04 tespit edildi. Atorvastatin grubunda ortalama 1,097 iken Ato+CAPE grubunda ortalama 0,984 olduğu ve CAPE grubunda ise ortalama 1,011 olduğu tespit edildi (Çizelge 4.11) (Şekil 4.10). Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde kontrol grubuna kıyasla Rosuvastatin grubunda NDUFA9 protein düzeylerinde artış olduğu (p: 0,0351) gözlenmiş bu artışın CAPE uygulaması neticesinde Ros+CAPE grubunda Rosuvastatin grubuna kıyasla düşürüldüğü fakat bu düşüşün istatistiki anlam ifade etmediği (p: 0,3398) tespit edilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta ise NDUFA9 protein düzeyleri kontrol grubuna benzer (p: 0,0955) bulunmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.10). NDUFA9 protein düzeylerinin CAPE (p: 0,9995) ve Ato+CAPE (p: 0,9974) gruplarında da kontrol grubuna benzer olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.10).

Çizelge 4.9. ATF4 protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	-0,5048	-0,7454 to -0,2641	<0,0001
Kontrol vs. Atorvastatin	0,1034	-0,1050 to 0,3118	0,6325
Kontrol vs. CAPE	0,1158	-0,09257 to 0,3243	0,5189
Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,04505	-0,2857 to 0,1956	0,9907
Kontrol vs. Ato+CAPE	-0,04578	-0,2542 to 0,1626	0,981
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	0,6081	0,3675 to 0,8488	<0,0001
Rosuvastatin vs. CAPE	0,6206	0,3800 to 0,8613	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	0,4597	0,1906 to 0,7288	0,0004
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	0,459	0,2183 to 0,6996	<0,0001
Atorvastatin vs. CAPE	0,01246	-0,1960 to 0,2209	>0,9999
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	-0,1484	-0,3891 to 0,09221	0,409
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	-0,1492	-0,3576 to 0,05925	0,2597
CAPE vs. Ros+CAPE	-0,1609	-0,4016 to 0,07976	0,3257
CAPE vs. Ato+CAPE	-0,1616	-0,3700 to 0,04679	0,1905
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	-0,0007254	-0,2414 to 0,2399	>0,9999

p<0,05 istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.10. CHOP protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	-0,8831	-1,112 to -0,6545	<0,0001
Kontrol vs. Atorvastatin	-0,155	-0,3530 to 0,04296	0,183
Kontrol vs. CAPE	-0,1452	-0,3432 to 0,05278	0,2376
Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,1701	-0,3987 to 0,05853	0,225
Kontrol vs. Ato+CAPE	0,1788	-0,01921 to 0,3768	0,0917
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	0,7281	0,4994 to 0,9567	<0,0001
Rosuvastatin vs. CAPE	0,7379	0,5092 to 0,9665	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	0,713	0,4574 to 0,9686	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	1,062	0,8332 to 1,290	<0,0001
Atorvastatin vs. CAPE	0,009817	-0,1882 to 0,2078	>0,9999
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	-0,01506	-0,2437 to 0,2136	>0,9999
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	0,3338	0,1358 to 0,5318	0,0004
CAPE vs. Ros+CAPE	-0,02488	-0,2535 to 0,2037	0,9993
CAPE vs. Ato+CAPE	0,324	0,1260 to 0,5220	0,0006
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	0,3489	0,1202 to 0,5775	0,0013

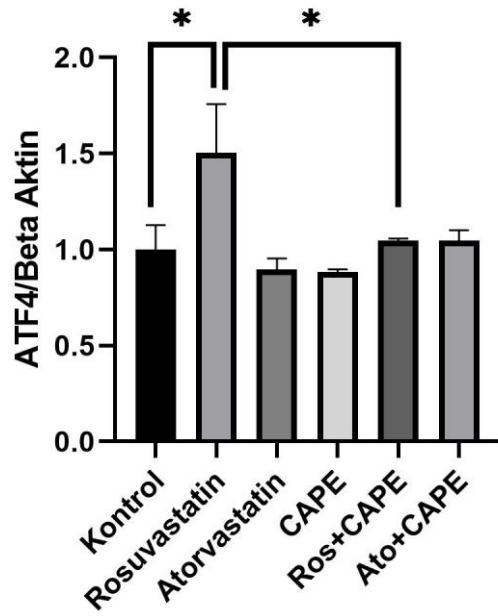
p<0,05 istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.11. NDUFA9 protein düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

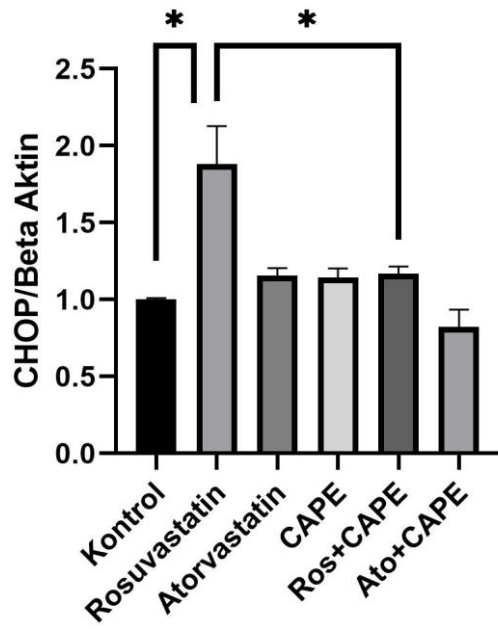
Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	-0,1323	-0,2578 to -0,006840	0,0351
Kontrol vs. Atorvastatin	-0,0974	-0,2061 to 0,01127	0,0955
Kontrol vs. CAPE	-0,01087	-0,1195 to 0,09780	0,9995
Kontrol vs. Ros+CAPE	-0,03982	-0,1653 to 0,08566	0,9134
Kontrol vs. Ato+CAPE	0,01542	-0,09325 to 0,1241	0,9974
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	0,03492	-0,09056 to 0,1604	0,9483
Rosuvastatin vs. CAPE	0,1215	-0,004032 to 0,2469	0,0614
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	0,0925	-0,04779 to 0,2328	0,3398
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	0,1477	0,02226 to 0,2732	0,0153
Atorvastatin vs. CAPE	0,08653	-0,02214 to 0,1952	0,1702
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	0,05758	-0,06790 to 0,1831	0,7022
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	0,1128	0,004154 to 0,2215	0,039

Ato+CAPE			
CAPE vs. Ros+CAPE	-0,02895	-0,1544 to 0,09653	0,9764
CAPE vs. Ato+CAPE	0,0263	-0,08238 to 0,1350	0,9711
Ros+CAPE Ato+CAPE	vs. 0,05525	-0,07024 to 0,1807	0,7358

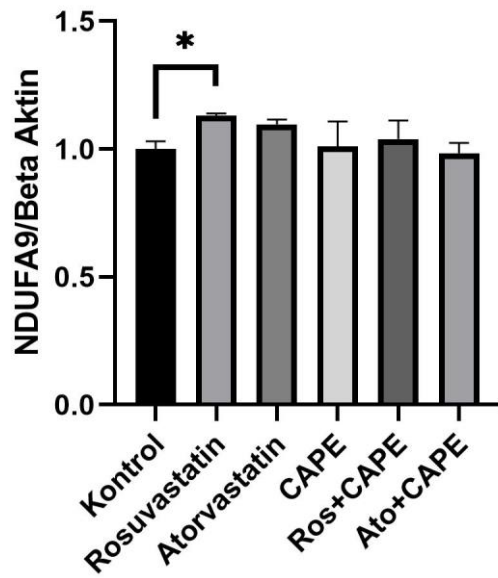
p<0,05 istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.



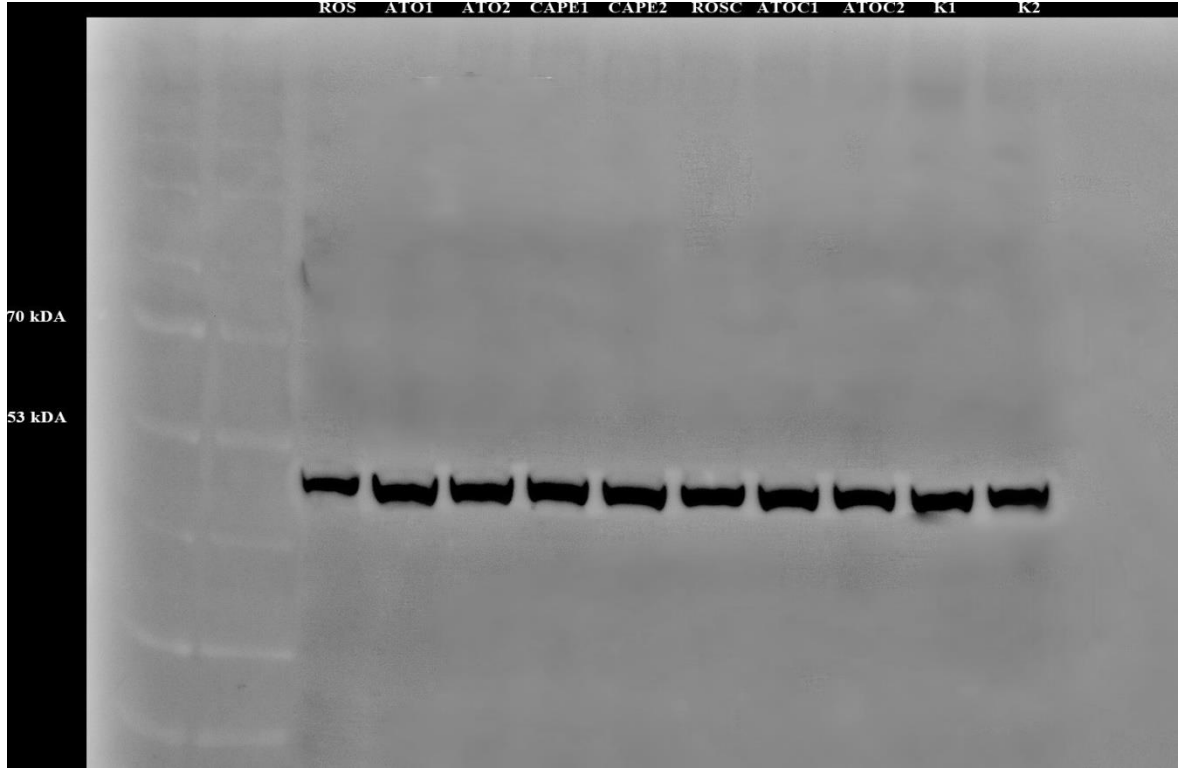
Şekil 4.8. ATF4/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.
(* p<0,05)



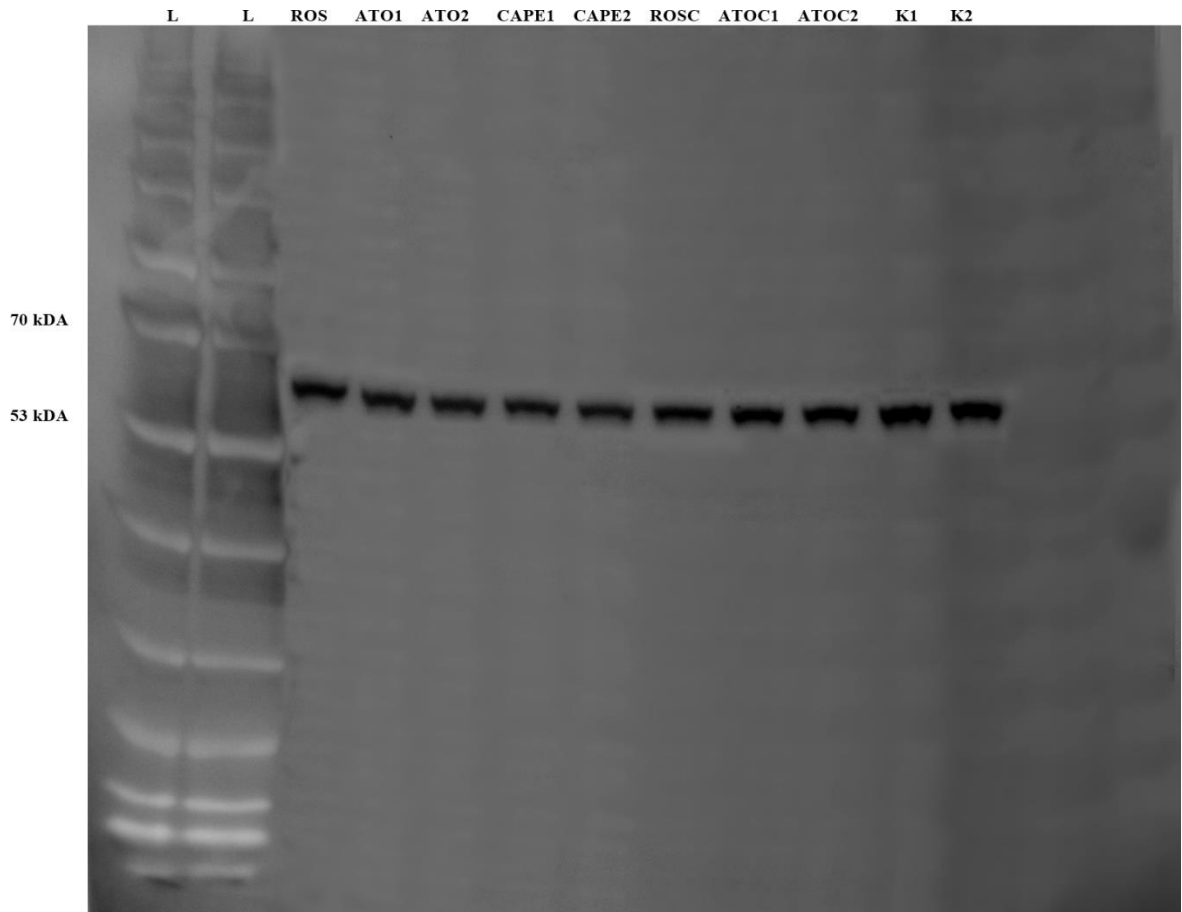
Şekil 4.9. CHOP/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.
(* $p < 0,05$)



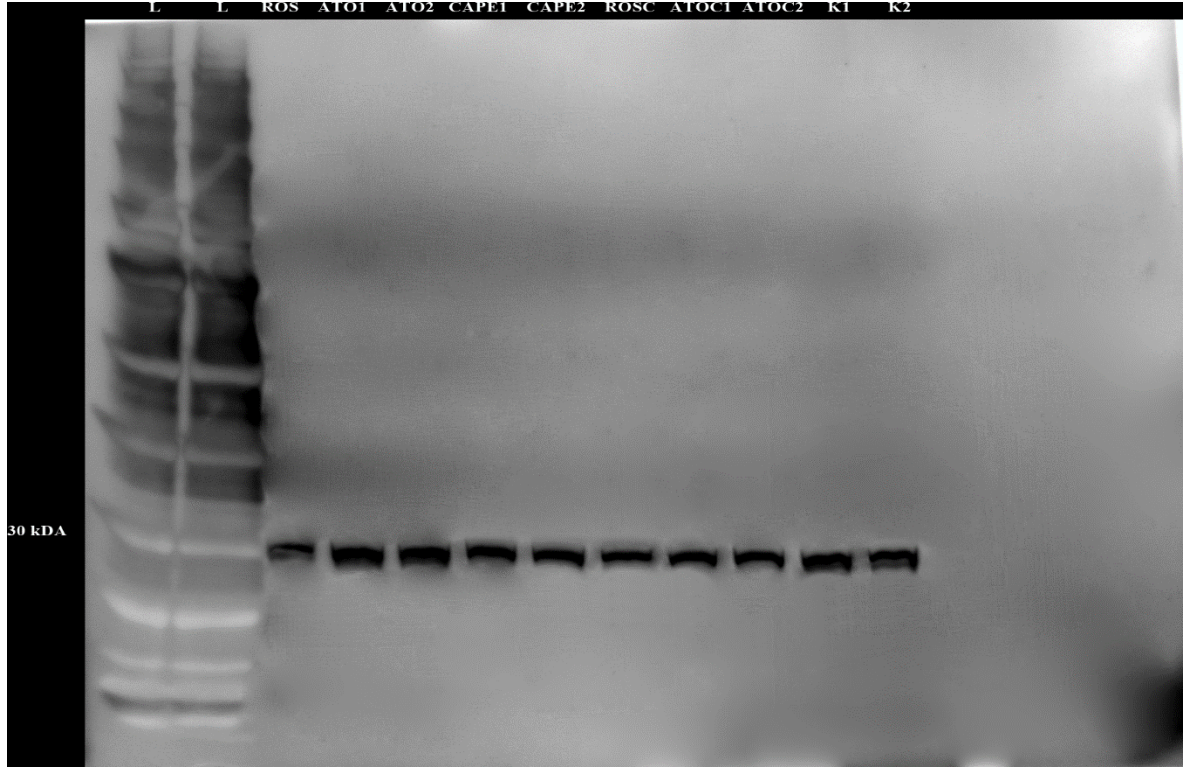
Şekil 4.10. NDUFA9/Beta Aktin protein düzeyi oranının gruplar arası kıyası.
(* $p < 0,05$)



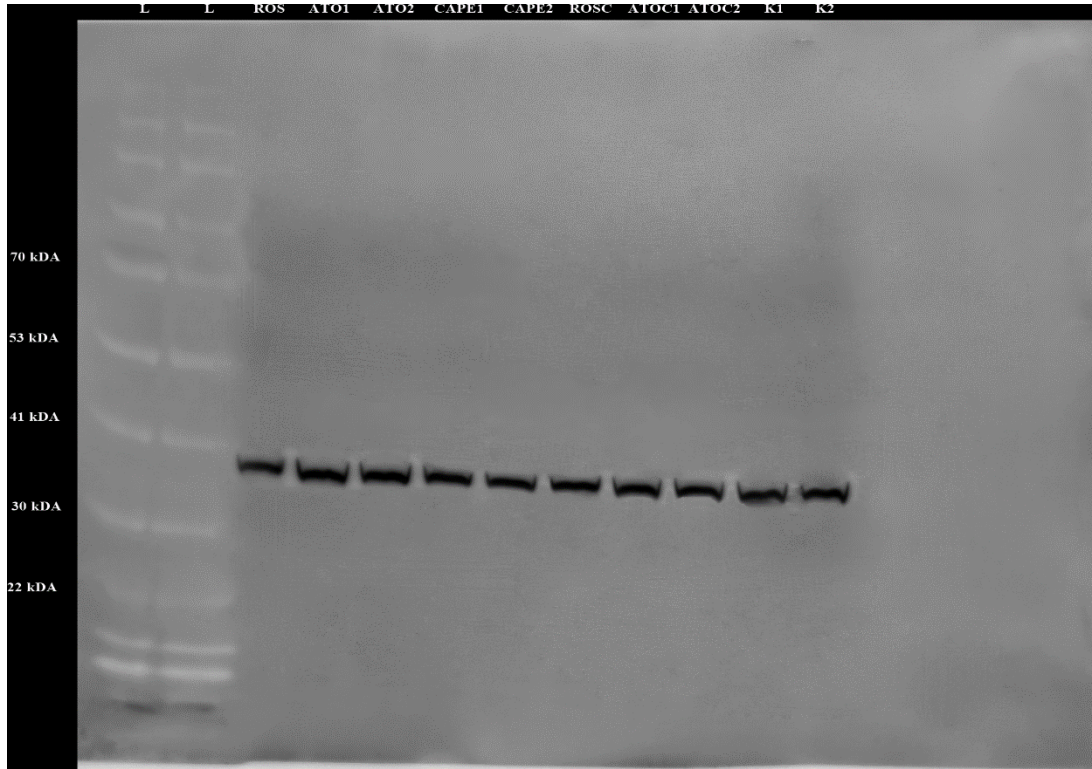
Resim 4.1. Beta Aktin proteinine ait western blot görüntüsü



Resim 4.2. ATF4 proteinine ait western blot görüntüsü



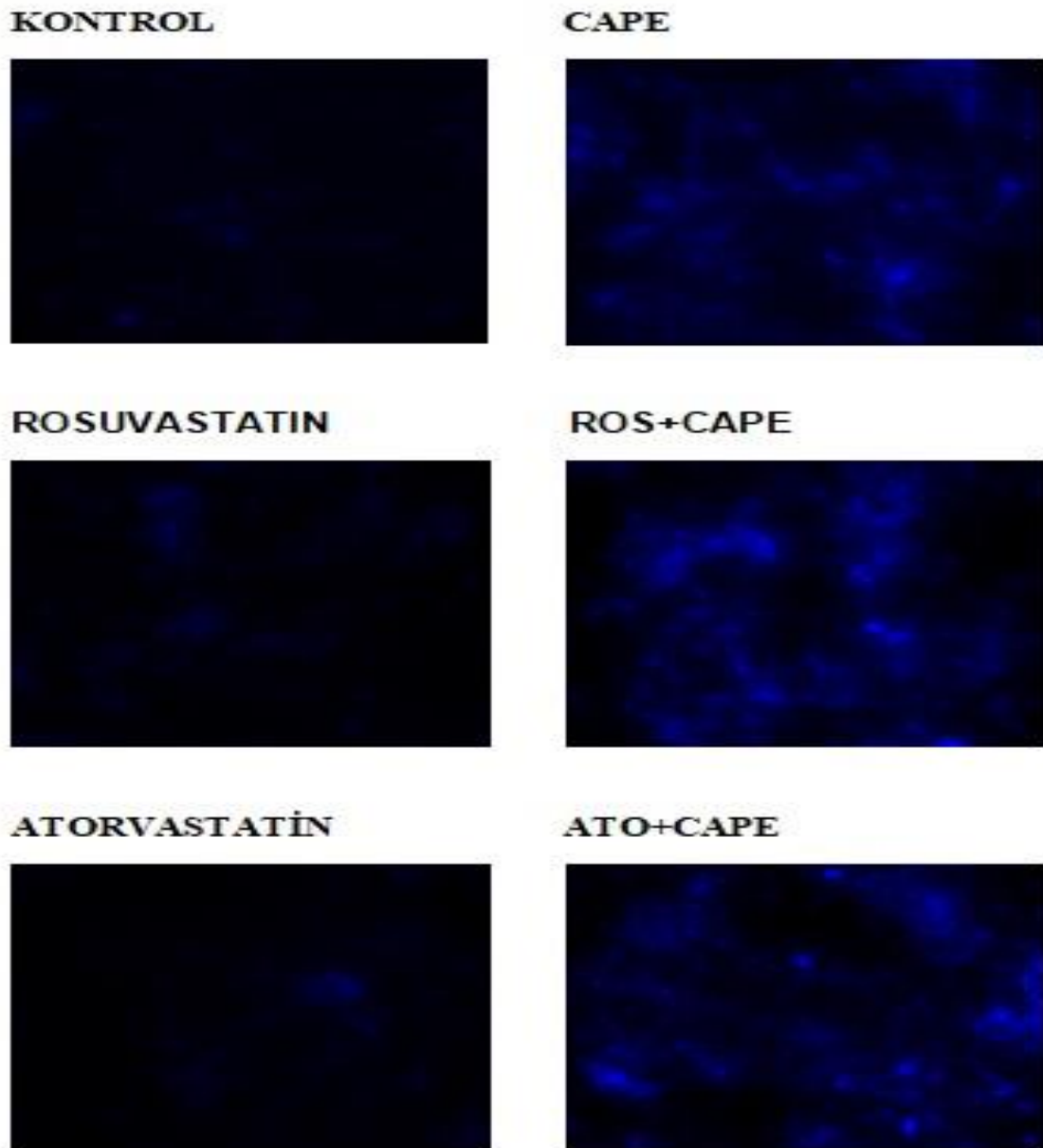
Resim 4.3. CHOP proteinine ait western blot görüntüsü



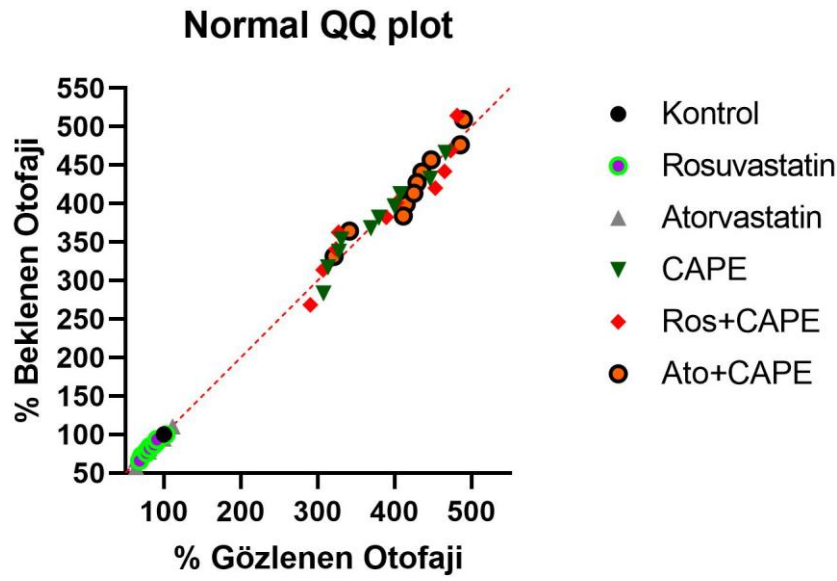
Resim 4.4. NDUFA9 proteinine ait western blot görüntüsü

4.6. Otofaji Assay Bulguları

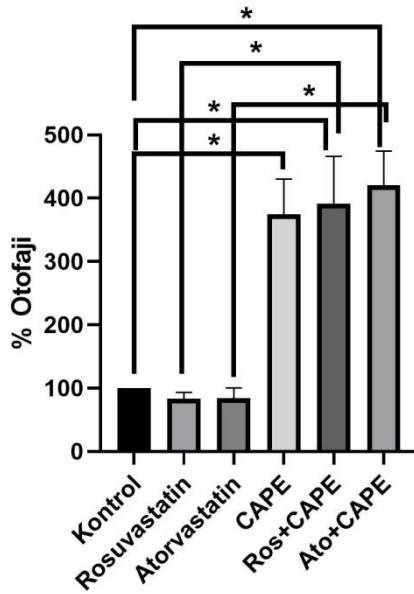
Otofaji analizleri neticesinde kontrol grubuna kıyasla % otofaji değerleri Rosuvastatin grubunda ortalama 83,02; Atorvastatin grubunda ortalama 84,02; CAPE grubunda ortalama 374,9; Ros+CAPE grubunda ortalama 391,5; Ato+CAPE grubunda ortalama 420,3 olarak hesaplandı (Resim 4.5) (Çizelge 4.12).



Resim 4.5. Floresans mikroskoptan alınan otofaji görüntüleri



Şekil 4.11. % Otofaji bulgularının normalite analizi



Şekil 4.12. Gruplar arası % otofaji bulguları
(* p<0,05)

Çizelge 4.12. Otofaji düzeylerinin gruplar arası istatistiksel kıyaslanması

Grupların birbiri ile kıyası	Ortalama Fark	%95 Güven Aralığı	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol vs. Rosuvastatin	16,98	-41,94 to 75,91	0,9561

Kontrol vs. Atorvastatin	15,98	-42,95 to 74,91	0,9661
Kontrol vs. CAPE	-274,9	-333,9 to -216,0	<0,0001
Kontrol vs. Ros+CAPE	-291,5	-350,4 to -232,5	<0,0001
Kontrol vs. Ato+CAPE	-320,3	-379,2 to -261,4	<0,0001
Rosuvastatin vs. Atorvastatin	-1,007	-59,94 to 57,92	>0,9999
Rosuvastatin vs. CAPE	-291,9	-350,8 to -233,0	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ros+CAPE	-308,5	-367,4 to -249,5	<0,0001
Rosuvastatin vs. Ato+CAPE	-337,3	-396,2 to -278,4	<0,0001
Atorvastatin vs. CAPE	-290,9	-349,8 to -232,0	<0,0001
Atorvastatin vs. Ros+CAPE	-307,4	-366,4 to -248,5	<0,0001
Atorvastatin vs. Ato+CAPE	-336,3	-395,2 to -277,4	<0,0001
CAPE vs. Ros+CAPE	-16,54	-75,47 to 42,39	0,9607
CAPE vs. Ato+CAPE	-45,38	-104,3 to 13,55	0,2221
Ros+CAPE vs. Ato+CAPE	-28,84	-87,77 to 30,09	0,6993

p<0,05 istatistiki anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

Bu verilere dayanılarak yapılan istatistiki analizlerde Rosuvastatin (p: 0,9561) ve Atorvastatin (p: 0,9661) gruplarında % otofaji değerleri kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. % otofaji değerleri CAPE, Ato+CAPE ve Ros+CAPE gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla artmış (p<0,0001) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12) (Çizelge 4.12).

5. TARTIŞMA

Zeng ve Liu yaptıkları çalışmada 20 mg/gün dozunda atorvastatin tedavisi uyguladıkları diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda oksidatif stres seviyelerinin yükseltildiğini ve antioksidan enzim aktivitelerinin ise azaltıldığını tespit etmiştir [128].

Pal ve arkadaşları sağlıklı fareleri 6 gruba ayırıp biri kontrol grubu olmak üzere diğer gruplara 8 hafta boyunca sırasıyla 1 mg/kg/gün, 5 mg/kg/gün, 10 mg/kg/gün, 30 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün dozlarında Atorvastatin uygulamış ve yüksek doz Atorvastatin kullanımında oksidatif stresin arttığını tespit etmiştir.

Urbano ve arkadaşları kronik Atorvastatin kullanıcısı olan hastalarda tip 2 diyabete yakalanma oranının kullanmayanlara nazaran yüksek olduğuna yönelik yayınlara rastladıklarını [130-132] rapor etmiştir [133]. Bu sebeple Nature dergisinde yayınlanan çalışmalarında Atorvastatinin doğrudan pankreas beta hücrelerinde oksidatif stres ve mitokondriyal hasara yönelik etkilerini araştırmıştır. Yaptıkları çalışmada pankreas beta hücrelerine 24 saat ve 48 saat boyunca 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozlarında Atorvastatin uygulamıştır. Sonuçta hem maruziyet süresinin uzamasıyla hem de dozun artışıyla orantılı olarak beta hücrelerinde oksidatif stresin artırıldığı gösterilmiştir [133].

Ozyurt ve arkadaşları anestezi uygulanmış sıçanlarda 2 saat boyunca tek taraflı (sağ) femoral arter klipslenmesi ve ardından 2 saat reperfüzyon ile iskemi oluşturmuşlardır. 2 saatlik reperfüzyondan sonra venöz kan örneği ve sağ gastroknemius kasından biyopsi örneği almışlardır. Plazma ve doku, MDA, SOD ve NO metabolitlerini analiz ettiklerinde hem doku hem de plazma NO seviyeleri, MDA seviyeleri, SOD aktiviteleri, kontrol gruplarına kıyasla iskemi reperfüzyon grubunda önemli ölçüde arttığını ve bu durumun intraperitoneal CAPE verilmesi sonucunda tersine çevrildiğini bu bakımdan CAPE'in isket kaslarını oksidatif hasardan koruyucu olduğunu rapor etmişlerdir [134]. Benzer şekilde Xu ve arkadaşları düz kas hücrelerinde NADPH oksidazı aktive etmekle süperoksit anyonu oluşumuna neden olan anjiyotensin 2 ile indüklenen oksidatif stresin CAPE uygulaması ile azaltıldığı göstermiştir [135].

Tez kapsamında yapılan oksidatif stres analizlerinde yukarıda sunulan literatür verilerine benzer şekilde Atorvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran OSI değerinin istatiki anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu ($p < 0,0001$) ve antioksidan kapasitenin ise yine kontrol grubuna kıyasla istatiki anlamlı olacak şekilde düşük bulunduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,0001$). Yine tez çalışması kapsamında elde edilen bulgulara göre CAPE uygulaması ile atorvastatinin neden olduğu oksidatif stress yukarıda sunulan literatür bilgilerine paralel olarak OSI değerlerini baskılamış ve atorvastatinin neden olduğu oksidatif hasarı tersine çevirmiştir ($p: 0,0007$) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

Her ne kadar Atorvastatinin oksidatif hasara neden olması ile alakalı yayınlar olsa da bunun tersini söyleyen yayınlara da rastlanmıştır. Bu yayınların çoğu hiperkolesterolemili hastaların statin kullanımına yönelik çalışmalar olduğu tespit edilmiştir. Hiperkolesterolemi, esas olarak NO'ı yok edebilen ve damar duvarındaki yararlı ve koruyucu etkilerini bozabilen serbest oksijen radikallerinin üretiminden kaynaklanan endotelial disfonksiyon ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla başlı başına hiperkolesterolemi oksidatif stres açısından risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır [136-138]. Zaten hiperkolesteroleminin yol açtığı bir oksidatif stresin olduğu in-vivo çalışmalarda Atorvastatinin hiperkolesterolemiyi baskılamak suretiyle oksidatif stresten korunma açısından olumlu katkılarının olduğu bilinmektedir [139]. Bu bağlamda bu tez çalışması kapsamında ele alınan her iki statin için de uygulanan doz, uygulama süresi ve hiperkolesterolemi varlığının OSI değeri açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

Erboğa ve arkadaşları sıçanlarda kadminyumun neden olduğu apoptozise karşı CAPE uygulamasının koruyucu etkinlikte olduğunu göstermiştir [140]. Bir başka çalışmada ise Aydın ve arkadaşları ratlarda yaptıkları deneylerde CAPE'in metilprednizolondan daha anti-apoptotik etkinlikte olduğunu ve CAPE'in omurilik yaralanmalarında apoptozu önleyerek olumlu etki yaptığını rapor etmişlerdir [141].

Eser ve arkadaşları bir nikotinik asetilkolin reseptör agonisti olan imidaclopridin apoptozise neden olduğunu histopatolojik olarak gösterip CAPE ile kombine edilmesi

halinde ise apoptozun tersine çevrildiğini ve CAPE'in antiapoptotik bir rol oynadığını göstermişlerdir [142].

Pal ve arkadaşları hem western blot ile Bax, Bcl-2, Cas9 ve Cas3 protein düzeylerine ve bu proteinlerin fosforillenme miktarlarına bakılarak hem de TUNEL yöntemi ile yüksek doz Atorvastatin uygulamasının apoptoza neden olduğunu rapor etmişlerdir [143].

Tez çalışması kapsamında yukarıda sunulan literatür verileri ile paralel olacak şekilde flow sitometrik analizler neticesinde elde edilen veriler hem atorvastatinin hem de rosuvastatinin IC₅₀ dozunda uygulanmaları apoptotik hücre sayısını kontrol grubuna nazaran istatistiksel anlamlı olacak şekilde artırmıştır ($p < 0,0001$). Aynı gruplara CAPE kombinasyonu yapıldığında ise apoptotik hücre sayısının kontrol grubu seviyesine düşürüldüğü yani statinlerin neden olduğu apoptotik hasarın CAPE uygulaması ile tersine çevrildiği gözlemlenmiştir. CAPE'in tez çalışması ile ortaya konan anti-apoptotik etkinliği yukarıda sunulan literatür verileri ile paralellik göstermektedir (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7).

Otofaji, hücrenin apoptozun geri döndürülemez ve nihai çözümüne başvurmadan önce stresi azaltma girişimini temsil etmektedir. Dolayısıyla otofaji hücrede strese neden olabilecek birçok uyurana karşı koruyucu bir mekanizma gibi devreye girebilmektedir. Bu nedenle, otofaji ve apoptoz arasındaki düzenleyici bağların oluşumunun, belirli bir stres sinyaliyle daha kontrollü ve kesin bir yanıt sağladığı için hücrelere evrimsel bir avantaj sağladığı düşünülmektedir [144].

Yang ve arkadaşları in vivo olarak Sprague-Dawley sıçanlarında in vitro olarak ise HSC-T6 hepatik hücre hatlarında CCl₄ ile indüklenen bir karaciğer fibroz modelinde karaciğer fibrozuna karşı CAPE'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada CAPE'in otofajiyi tektiklemek suretiyle karaciğer fibrogenizini zayıflatarak karaciğer fibrozuna karşı koruyucu etkinlikte olduğunu göstermişlerdir [145].

Eğer hücreler otofajiden kaçabilirlerse apoptozise giden süreç başlamaktadır [10]. Bu tez çalışması kapsamında otofaji çalışmalarında her iki statinin de otofajiden kaçınabildikleri gözlemlenmiştir. Bu sonucumuzla paralel olarak literatür verilerinde de HMGCoA

redüktazın otofajiyi tetiklediği dolayısıyla HMGCoA redüktaz inhibitörlerinin bu açıdan antiotofajik etkinlikte olduğu vurgulanmaktadır [146].

Dikic ve arkadaşları Nature Reviews dergisinde yayınladıkları derlemelerinde; otofajinin nörodejeneratif hastalıkların kusurlu mitokondri ve toksik protein kümelerini ortadan kaldırarak nörodejenerasyona karşı koruma sağladığını ve azalan otofaji aktivitesinin (yaşa bağlı, farmakolojik veya genetik nedenli) bu nedenle nörodejeneratif hastalık riskini artırdığını vurgulamıştır. Hatta otofajinin yapay olarak dışarıdan uyarımı ile nörodejeneratif hastalıklara karşı etkili bir terapötik strateji olabileceğini öne sürmüşlerdir [147]. Bu bağlamda otofaji çalışmamızda hem Rosuvastatin (p: 0,9561) hem de Atorvastatininin (p: 0,9661) kontrol grubuyla benzer bulunması ve hem Rosuvastatin hem de Atorvastatininin flow sitometrik analizlerle apoptozu kontrol grubuna nazaran artırması ($p<0,0001$) sonucunda her iki statinin de uygulandığı hücreler otofajiye yakalanmadıkları için apoptoza sürüklendikleri yorumu yapılmıştır (Şekil 4.11 ve 4.12) (Çizelge 4.12).

HMG-CoA redüktaz inhibisyonu, BIP/GRP78'deki bir artışla UPR/ER stresini ve apoptozu desteklemek için CHOP'u aktive eden ATF4 ve PERK'in aktivasyonunu teşvik etmektedir. IREa1 ayrıca apoptozu daha da destekleyen Bcl-2 kaybına katkıda bulunan JNK fosforilasyonuna (P-JNK) yol açmaktadır [148].

Çalışmamız kapsamında western blot tekniği ile analiz edilen ER stresini için belirteç olan ATF4 ve CHOP protein düzeyleri Atorvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran benzer bulunmuştur (p: 0,6325). Rosuvastatin uygulanan grupta ise her iki protein düzeyi de kontrol grubuna nazaran artırılmıştır ($p<0,0001$). Bu bakımdan RD hücre hatlarında Atorvastatin uygulaması ile ER stresini gözlenmezken Rosuvastatin uygulaması ER stresini oluşturmuştur. Çalışmamızda Rosuvastatin uygulaması ile ATF4 üzerinden CHOP seviyeleri artırılmak suretiyle apoptotik sürecin başlatıldığı yorumu yapılmıştır (Şekil 4.8 ve 4.9).

NDUFA9, mitokondri iç zarında yer alan elektron taşıma zincirindeki ilk enzim kompleksi olan NADH: ubikinon oksidoredüktazın (kompleks I) hidrofobik protein fraksiyonunun bir alt birimidir. NDUFA9 çoğu zaman elektron taşıma zinciri kompleks I'in fonksiyonel durumu ile ilişkilendirilmekle beraber [149] literatür verilerinde statinlerin ve CAPE'in

NDUFA9 üzerine yaptığı etkilere yönelik verilere rastlanamamıştır. Çalışmamızda western blot tekniği ile NDUFA9 düzeylerinin analizinde Atorvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran bir fark bulunmazken (p: 0,0955) Rosuvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran yükseklik tespit edilmiştir (p: 0,0351). Bu bağlamda Rosuvastatinin kompleks I üzerinden mitokondriyal aktivasyona neden olduğu fakat aynı etkinin Atorvastatinde gözlenmediği tespit edilmiştir. Rosuvastatinin CAPE ile kombinasyonu neticesinde NDUFA9 düzeylerinde düşüş gözlenmiş fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p: 0,3398). Rosuvastatin uygulanan hücrelerin mitokondriyal aktivasyonu teşviki yoluyla ATP üretimini de teşvik edeceği ve enerji yokluğuyla ilişkilendirilen otofajiden bu yolla kaçınmış olabileceği diğer taraftan otofajiden kaçışı nedeniyle apoptoza maruz kalınan yolun engellenemediği düşünülmüştür (Şekil 4.10)

Tez çalışması kapsamında Atorvastatin ve Rosuvastatinin miyopatiye neden olabileceğini düşündüren yollar deneysel olarak test edilmiş ER stres yolağı hariç diğer yollar için finansal zorluklar nedeniyle moleküler düzeyde ayrıntılı analiz yapılamamıştır. Bu durum tez çalışmasının en önemli kısıtlılığı olarak değerlendirilmiştir. Bir diğer kısıtlılık ise otofaji çalışmalarında her ne kadar otofaji gözlenen gruplarda çok bariz bir floresans yoğunluğu gözlenirse de bu yoğunluk 96'lık plakalardan rastgele çekilen fotoğrafların imaj analiz programında analiz edilmesi ile rakama dönüştürülmüştür. Sigmadan temin edilen otofaji kiti floresan mikroskopi görüntülerinden otofajinin analiz edilebileceğini söylemesine karşın, floresans mikropilaka okuyucu ile yapılacak bir ölçümün çok daha geçerli ve genellenebilecek sonuçlar vereceği düşünülmüş ve bu durum tez çalışmasının bir diğer kısıtlılığı olarak değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ

Statinlerin yüksek dozda ve kronik kullanımında kas hasarına neden olarak serum CK aktivite artışı ve serum kreatinin düzeylerinde yükselme ile nadirde olsa rabdomyoliz neticesinde böbrek yetmezliğine giren hastalara dahi rastlanılabilmektedir. Yüksek doz statin kullanımı ileri düzeyde bir hasar bırakmasa dahi kas ağrıları nedeniyle kullanımına ara verilebilmekte hatta kullanmaktan vazgeçilmektedir. Statinlerin kardiyovasküler hastalıklardan korunmada sağladıkları fayda ise tartışmasızdır. Bu bakımdan statin kullanımını terk etmek zorunda kalan hastaların hiperkolesterolemiyi baskılamak adına çok fazla seçeneği de bulmamaktadır. Bu şartlarda statin kullanımının hasta yararına olduğu durumlarda statinlerle beraber CAPE kombinasyonunun olumlu etkileri olabileceği deneysel olarak bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Bu bağlamda en çok reçetelenen ve kaslar üzerine yan etki gösterdiğinden şüphelenilen statinlerden olan Atorvastatini ve Rosuvastatini tez çalışmasının kapsamına almaya karar verilmiştir. Her iki statinin de neden olacağı muhtemel olumsuzlukların bertarafında ise koruyucu ajan olarak kardiyoprotektif etkinliği kanıtlanmış fakat iskelet kasları üzerine etkisi henüz bilinmeyen bir ajan olan CAPE tercih edilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran oksidatif stresin, apoptotik hücre sayısının, nekrotik hücre sayısının artırıldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda Atorvastatinin oksidatif stres oluşturarak apoptoza giden yolu açmış olabileceği düşünülmüştür. Rosuvastatin uygulanan grupta ise kontrol grubuna nazaran ER stres belirteçleri olan ATF4 ve CHOP protein düzeylerinin artışı ve bu yol üzerinden hücrelerin apoptoza gittikleri tespit edilmiştir. Yine NDUFA9 protein düzeylerini artırmak suretiyle mitokondriyal aktivitenin artırıldığı ve bu yolla Rosuvastatin uygulanan hücrelerde otofajiden kaçınılabildiği de değerlendirilmiştir. Her iki statinin de farklı yollar üzerinden apoptoza neden oldukları değerlendirilip her iki statinin miyopatiye neden olabilecek bu olumsuz etkilerinin CAPE ile beraber kombine edilmeleri durumunda geriye döndürüldüğü CAPE'in bu anlamda statin aracılı miyopati açısından koruyucu özellikte olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Sirtori C. R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*, 88, 3-11.
2. Stroes E. S., Thompson P. D., Corsini A., Vladutiu G. D., Raal F. J., Ray K. K., Roden M., Stein E., Tokgözoğlu L., Nordestgaard B. G., Bruckert E., De Backer G., Krauss R. M., Laufs U., Santos R. D., Hegele R. A., Hovingh G. K., Leiter L. A., Mach F., März W., Newman C. B., Wiklund O., Jacobson T. A., Catapano A. L., Chapman M. J., Ginsberg H. N. (2015). European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *European Heart Journal*, 36(17), 1012-1022.
3. Nielsen S. F., Nordestgaard B. G. (2014). Statin use before diabetes and risk of microvasculardisease: a nationwide nested matched study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2, 894- 900.
4. Nielsen S. F., Nordestgaard B. G., Bojesen S. E. (2012). Statin use and reduced cancer-relatedmortality. *The New England Journal of Medicine*, 367, 1792-1802.
5. Zhang P., Tang Y., Li N. G., Zhu Y., Duan J. A. (2014). Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules*. 19(10), 16458-16476.
6. Li D., Wang X., Huang Q., Li S., Zhou Y., Li Z. (2018). Cardioprotection of CAPE-oNO 2 against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF-κB pathway in vivo and in vitro. *Redox Biology*, 15, 62-73.
7. Parlakpınar H., Sahna E., Acet A., Mizrak B., Polat A. (2005). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death. *Toxicology*. 2005 Apr 1;209(1):1-14.
8. Wallach-Kildemoes H., Stovring H., Holme Hansen E., Howse K., Pétursson H. (2016). Statin prescribing according to gender, age and indication: what about the benefit-risk balance? *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, 22(2), 235-246.
9. Schachter M. (2004). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 19(1),117–125.
10. wallac du Souich P., Roederer G., Dufour R. (2017). Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacology and Therapeutics*, 175, 1-16.
11. Yokoyama C., Wang X., Briggs M. R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J. L., Brown M. S..(1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 75(1), 187-197.
12. Vaughan, C. J., Gotto A. M., Basson C. T. (2000). The evolving role of the statins in the management of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(1), 1-10.

13. Kizilirmak B., Ongen Z., Kayıkcıoğlu M., Tokgozoglu L. (2020). Evaluation of statin use on LDL cholesterol levels in Turkey: A systematic review. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 48(2), 137-148.
14. Parmar B., Francis P. J., Ragge N. K. (2002). Statins, fibrates, and ocular myasthenia. *Lancet*. 360(9334), 717.
15. Cartwright M. S., Jeffery D. R., Nuss G. R., Donofrio P. D. (2004). Statin-associated exacerbation of myasthenia gravis. *Neurology*. 63(11), 2188.
16. Phillips P. S., Haas R. H., Bannykh S., Hathaway S., Gray N. L., Kimura B. J., Vladutiu G. D., England J. D. (2002). Scripps Mercy Clinical Research Center. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Annals of Internal Medicine*, 137, 581 – 585
17. Chariot P., Abadia R., Agnus D., Danan C., Charpentier C., Gherardi R. K. (1993). Simvastatin-induced rhabdomyolysis followed by a MELAS syndrome. *The American Journal of Medicine*, 94(1), 109-110.
18. Tsivgoulis G., Spengos K., Karandreas N., Panas M., Kladi A., Manta P. (2006). Presymptomatic neuromuscular disorders disclosed following statin treatment. *Archives of Internal Medicine*, 166(14), 1519-1524.
19. Livingstone C., Al Riyami S., Wilkins P., Ferns G. A. (2004). McArdle's disease diagnosed following statin-induced myositis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 41, 338.
20. Baker S. K., Vladutiu G. D., Tarnopolsky M. A. (2003). McArdle disease unmasked by statin exposure. *Muscle and Nerve* 2003(12), 73.
21. Voermans N. C., Lammens M., Wevers R. A., Hermus A. R., van Engelen B. G. (2010). Statin-disclosed acid maltase deficiency. *Journal of Internal Medicine*, 258(2), 196-197.
22. Echaniz-Laguna A., Mohr M., Tranchant C. (2010). Neuromuscular symptoms and elevated creatine kinase after statin withdrawal. *The New England Journal of Medicine*, 362, 564.
23. Delgado-López F., Bautista-Lorite J., Villamil-Fernández F. (2004). Worsening for using statin in carnitine palmitoyl transferase deficiency myopathy. *Revue Neurologique* , 38, 1095.
24. Baker S. K., Tarnopolsky M. A. (2006). Sporadic rippling muscle disease unmasked by simvastatin. *Muscle and Nerve*, 34, 478.
25. Knoblauch H, Schoewel V, Kress W, et al. Another side to statin-related side effects. *Annals of Internal Medicine* 2010; 152:478.
26. Zinman L., Sadeghi R., Gawel M., Patton D., Kiss A. (2008). Are statin medications safe in patients with ALS? *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 9(4), 223-238.

27. Brunham L. R., Baker S., Mammen A., Mancini G. B. J., Rosenson R. S. Role of genetics in the prediction of statin-associated muscle symptoms and optimization of statin use and adherence. *Cardiovascular Research*, 114(8), 1073-1081.
28. Adams S. P., Tsang M., Wright J. M. (2015). Lipid-lowering efficacy of atorvastatin. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(3), 00 8226.
29. Grundy S. M., Stone N. J., Bailey A. L., Beam C., Birtcher K. K., Blumenthal R. S., Braun L. T., de Ferranti S., Faiella-Tommasino J., Forman D. E., Goldberg R., Heidenreich P. A., Hlatky M. A., Jones D. W., Lloyd-Jones D., Lopez-Pajares N., Ndumele C. E., Orringer C. E., Peralta C. A., Saseen J. J., Smith S. C. Jr., Sperling L., Virani S. S., Yeboah J. (2019). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 139(25), 1082-1143.
30. Stone N. J., Robinson J. G., Lichtenstein A. H., Bairey Merz C. N., Blum C. B., Eckel R. H., Goldberg A. C., Gordon D., Levy D., Lloyd-Jones D. M., McBride P., Schwartz J. S., Shero S. T., Smith S. C. Jr., Watson K., Wilson P. W., Eddleman K. M., Jarrett N. M., LaBresh K., Nevo L., Wnek J., Anderson J. L., Halperin J. L., Albert N. M., Bozkurt B., Brindis R. G., Curtis L. H., DeMets D., Hochman J. S., Kovacs R. J., Ohman E. M., Pressler S. J., Sellke F. W., Shen W. K., Smith S. C. Jr., Tomaselli G., American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. (2015). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 129(25,2), 1-45. Erratum in: *Circulation*. 129(25), 46-48. Erratum in: *Circulation*, 132(25), 396.
31. Smilde T. J., van Wissen S., Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2001;357(9256):577-581.
32. Stein E. A., Strutt K., Southworth H., Diggle P. J., Miller E. (2003). HeFH Study Group. Comparison of rosuvastatin versus atorvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *American Journal of Cardiology*, 92(11), 1287-1293.
33. Lins R. L., Matthys K. E., Verpooten G. A., Peeters P. C., Dratwa M., Stolear J. C., Lameire N. H. (2003). Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18(5), 967–976.
34. Schachter M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 19, 117-125.
35. Goodman L. S., Brunton L. L., Chabner B., Knollmann B. C. (2011). *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*. (12th Edition). New York: McGraw-Hill

36. Moghadasian M. H. (1999). Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sciences*, 65(13),1329-1337.
37. Gaw A., Packard C. J., Shepherd J. (2000). *Statins: The HMG CoA Reductase Inhibitors in Perspective*. London, England: Martin Dunitz Ltd.
38. Liao J..K., Laufs U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 89-118.
39. Parker B. A , Capizzi J. A., Grimaldi A. S., Clarkson P. M., Cole S. M., Keadle J., Chipkin S., Pescatello L. S., Simpson K., White C. M., Thompson P. D. (2013). Effect of statins on skeletal muscle function. *Circulation*, 127(1), 96-103.
40. Villaverde Piñeiro L., Pérez Castro A., Ares Castro-Conde B., Cachafeiro Pin A. I. (2021). Atorvastatin induced rhabdomyolysis: Utility of determining genetic polymorphisms. *Farmacia Hospitalaria*, 46(2), 96-97.
41. Lambert C. T., Sandesara P., Isiadinso I., Gongora M. C., Eapen D., Bhatia N., Baer J. T., Sperling L. (2014). Current Treatment of Familial Hypercholesterolaemia. *European Cardiology Review*. 9(2), 76-81.
42. Stein E. A., Ose L., Retterstøl K., Tonstad S., Schleman M., Harris S., Sager P. (2007). Further reduction of low-density lipoprotein cholesterol and C-reactive protein with the addition of ezetimibe to maximum-dose rosuvastatin in patients with severe hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 1(4), 280-286.
43. Ridker P. M., Danielson E., Fonseca F. A., Genest J., Gotto A. M. Jr., Kastelein J. J., Koenig W., Libby P., Lorenzatti A. J., MacFadyen J. G., Nordestgaard B. G., Shepherd J., Willerson J. T., Glynn R. J. (2008). JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *The New England Journal of Medicine*, 359(21), 2195-2207.
44. Sathasivam S., Lecky B. (2008). Statin induced myopathy. *British Medical Journal*, 337,2286.
45. Jacobson T. A., Cheeley M. K., Jones P. H., La Forge R., Maki K. C., López J. A. G., Xiang P., Bushnell D. M., Martin M. L., Cohen J. D. (2019). The STatin Adverse Treatment Experience Survey: Experience of patients reporting side effects of statin therapy. *Journal of Clinical Lipidology*, 13(3), 415-424.
46. Bruckert E., Hayem G., Dejager S., Yau C., Bégaud B. (2005). Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 19(6), 403-414.
47. Hansen K. E., Hildebrand J..P, Ferguson E. E., Stein J. H. (2005). Outcomes in 45 patients with statin-associated myopathy. *Archives of Internal Medicine* , 165(22), 2671-2676.
48. Giordano N., Senesi M., Mattii G., Battisti E., Villanova M., Gennari C. (1997). Polymyositis associated with simvastatin. *Lancet*, 349(9065), 1600-1601.

49. Goldman J. A., Fishman A. B., Lee J. E., Johnson R. J. (1989). The role of cholesterol-lowering agents in drug-induced rhabdomyolysis and polymyositis. *Arthritis and Rheumatology*, 32(3), 358-359.
50. Vasconcelos O. M., Campbell W. W. (2004). Dermatomyositis-like syndrome and HMG-CoA reductase inhibitor (statin) intake. *Muscle and Nerve*, 30(6), 803-807.
51. Noël B., Cerottini J. P., Panizzon R. G. (2001). Atorvastatin-induced dermatomyositis. *The American Journal of Medicine*, 110(8), 670-681.
52. Khattak F. H., Morris I. M., Branford W. A. (1994). Simvastatin-associated dermatomyositis. *British Journal of Rheumatology*, 33(2), 199.
53. Grable-Esposito P., Katzberg H. D., Greenberg S. A., Srinivasan J., Katz J., Amato A. A. (2010). Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle and Nerve*, (2), 185-190.
54. Wu Y., Lach B., Provias J. P., Tarnopolsky M. A., Baker S. K. (2014). Statin-associated Autoimmune Myopathies: A Pathophysiologic Spectrum. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 41(5), 638-647.
55. Needham M., Mastaglia F. L. (2014). Statin myotoxicity: a review of genetic susceptibility factors. *Neuromuscular Disorders*, 24(1), 4-15.
56. Taha D. A., deMoor C. H., Barrett D. A., Gershkovich P. (2014). Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies. *Translational Research*, 164, 85-109.
57. Chatzizisis Y. S., Koskinas K. C., Misirli G. (2010). Risk factor sand drug interactions predisposing to statin-induced myopathy: implications for risk assessment, prevention and treatment. *Drug Safety*, 33, 171-187.
58. Rosenson R. S., Baker S. K., Jacobson T. A., Kopecky S. L., Parker B. A. (2014). The National Lipid Association's Muscle Safety Expert Panel. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force. *Journal of Clinical Lipidology*, 8(3), 58-71.
59. Mefford M. T., Tajeu G. S., Tanner R. M., Colantonio L. D., Monda K. L., Dent R., Farkouh M. E., Rosenson R. S., Safford M. M., Muntner P. (2018). Willingness to be Reinitiated on a Statin (from the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study). *American Journal of Cardiology*, 122(5), 768-774.
60. Cohen J. D., Brinton E. A., Ito M. K., Jacobson T. A. (2012). Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE): an internet-based survey of 10,138 current and former statin users. *Journal of Clinical Lipidology*, 6(3), 208-215.
61. Ghirlanda G., Oradei A., Manto A., Lippa S., Uccioli L., Caputo S., Greco A. V., Littarru G. P. (1993). Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Pharmacology*, 33(3), 226-229.

62. Rundek T., Naini A., Sacco R., Coates K., DiMauro S. (2004). Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke. *Archives of Neurology*, 61(6), 889-892.
63. Päivä H., Thelen K. M., Van Coster R., Smet J., De Paepe B., Mattila K. M., Laakso J., Lehtimäki T., von Bergmann K., Lütjohann D., Laaksonen R. (2005). High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: a randomized, controlled trial. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 78(1), 60-68.
64. Banach M., Serban C., Ursoniu S., Rysz J., Muntner P., Toth P. P., Jones S. R., Rizzo M., Glasser S. P., Watts G. F., Blumenthal R. S., Lip G. Y., Mikhailidis D. P., Sahebkar A. (2015). Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration (LBPMC) Group. Statin therapy and plasma coenzyme Q10 concentrations--A systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Pharmacological Research*, 99, 329-336.
65. Phillips P. S., Haas R. H., Bannykh S., Hathaway S., Gray N. L., Kimura B. J., Vladutiu G. D., England J. D. (2002). Scripps Mercy Clinical Research Center. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Annals of Internal Medicine*, 137, 581 – 585
66. Schick B. A., Laaksonen R., Frohlich J. J., Päivä H., Lehtimäki T., Humphries K. H., Coates H. C. (2007). Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients treated with high-dose simvastatin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81, 650-653.
67. Stringer H. A., Sohi G. K., Maguire J. A., Coates H. C. (2013). Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients with statin-induced myopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 325, 142 – 147.
68. Celik S., Şen S. (2015). Endoplasmik Retikulum Stresine Cevap Yolakları ve Tip 2 Diyabet Patogenezinde Endoplasmik Retikulum Stres Aracılı Beta Hücre Apoptosisinin Rolü. *Kocatepe Medical Journal*, 16, 227-237.
69. Rajan S.S., Srinivasan V., Balasubramanyam M., Tatu U. (2007). Endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes. *Indian Journal of Medical Research*, 125, 411-424.
70. Afroze D., Kumar A. (2019). ER stress in skeletal muscle remodeling and myopathies. *The FEBS Journal*, 286(2), 379-398.
71. Zito E. (2019). Targeting ER stress/ER stress response in myopathies. *Redox Biology*, 26, 101232.
72. Mollazadeh H., Atkin S. L., Butler A. E., Ruscica M., Sirtori C. R., Sahebkar A. (2018). The effect of statin therapy on endoplasmic reticulum stress. *Pharmacological Research*, 137, 150-158.
73. Needham M., Fabian V., Knezevic W., Panegyres P., Zilko P., Mastaglia F. L. (2007). Progressive myopathy with up-regulation of MHC-I associated with statin therapy. *Neuromuscular Disorders*, 17(2), 194-200

74. Confalonieri P., Oliva L., Andreetta F., Lorenzoni R., Dassi P., Mariani E., Morandi L., Mora M., Cornelio F., Mantegazza R. (2003). Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *Journal of Neuroimmunology*, 142 (1), 130-136.
75. Moosmann B., Behl C. (2004). Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet*, 363(9412), 892-894.
76. Jamal S. M., Eisenberg M. J., Christopoulos S. (2004). Rhabdomyolysis associated with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *American Heart Journal*, 147 (6), 956-965
77. Przybyłek I., Karpiński T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 224(11), 2047.
78. Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K. H., Reichling J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, 24(1), 20-28.
79. Ramanauskiene K., Inkeniene A., Propolis oil extract: Quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 25, 1463-1468.
80. Franchin M., C lon D. F., Castanheira F. V., da Cunha M. G., Bueno-Silva B., Alencar S. M., Cunha T. M., Rosalen P. L. (2016). Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products*, 79(4), 954-960.
81. De Freitas, M.C.D., de Miranda M.B., de Oliveira D. T., Vieira-Filho, S.A., Caligiore R. B., de Figueiredo S. M. (2017). Biological activities of red propolis: A review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 11, 3–12.
82. Olgierd B., Kamila  ., Anna B., Emilia M. (2021). The Pluripotent Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Molecules*, 26(5), 1335.
83. Tolba M. F., Azab S. S., Khalifa A. E. Abdel-Rahman S. Z. Abdel-Naim A. B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*, 65, 699-709.
84. Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E. M., Efros L., Caldwell M., Estevez V., Nakanishi K. (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44(3), 230-232.
85. Murtaza G., Karim S., Akram M. R., Khan S. A., Azhar S., Mumtaz A., Bin Asad M. H. (2014). Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *BioMed Research International*, 2014, 145342.
86. Kumazawa S., Ahn M. R., Fujimoto T., Kato M. (2010). Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Natural Product Research*, 24(9), 804-812.

87. Vijayakurup V., Spatafora C., Tringali C., Jayakrishnan P. C, Srinivas P., Gopala S. (2014). Phenethyl caffeate benzoxanthene lignan is a derivative of caffeic acid phenethyl ester that induces bystander autophagy in WiDr cells. *Molecular Biology Reports*, 41(1), 85-94.
88. Vijayakurup V., Carmela S., Carmelo D., Corrado T., Srinivas P., Gopala S. (2012). Phenethyl caffeate benzo[kl]xanthene lignan with DNA interacting properties induces DNA damage and apoptosis in colon cancer cells. *Life Sciences*, 91, 1336-1344.
89. Hao R., Li F., Song X., Tan X., Sun-Waterhouse D., Li D. (2020). Caffeic acid phenethyl ester against cadmium induced toxicity mediated by CircRNA modulates autophagy in HepG2 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110610.
90. Tomiyama R., Takakura, K., Takatou, S., Le, T. M., Nishiuchi, T., Nakamura Y., Konishi T., Matsugo S., Hori O. (2017). 3,4- dihydroxybenzalacetone and caffeic acid phenethyl ester induce preconditioning ER stress and autophagy in SH-SY5Y cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 1671-1684.
91. Chang, H., Wang Y., Yin X., Liu X.; Xua, H. (2017). Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 417.
92. Taylor E., Kim Y., Zhang K., Chau L., Nguyen B. C., Rayalam S., Wang X. (2022). Antiaging Mechanism of Natural Compounds: Effects on Autophagy and Oxidative Stress. *Molecules*. 27(14), 4396.
93. Shao B., Wang M., Chen A., Zhang C., Lin L., Zhang Z., Chen A. (2020). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against imidacloprid-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation and apoptosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164, 122-129.
94. Akyol S., Akbas A., Butun I., Toktas M., Ozyurt H., Sahin S., Akyol O. (2015). Caffeic acid phenethyl ester as a remedial agent for reproductive functions and oxidative stress-based pathologies of gonads. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 4(2), 187-191.
95. Gong P., Chen F., Liu X., Gong X., Wang J., Ma Y. (2012). Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against cadmium-induced renal damage in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*. 37(2), 415-425.
96. Ogeturk M., Kus I., Colakoglu N., Zararsiz I., Ilhan N., Sarsilmaz M. (2005). Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 273-80.
97. Ozyurt B., Iraz M., Koca K., Ozyurt H., Sahin S. (2006). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 292(1-2),197-203.
98. Ou H., Liu C., Feng W., Xiao X., Tang S., Mo Z. (2018). Role of AMPK in atherosclerosis via autophagy regulation. *Science China Life Sciences*, 61(10), 1212-1221.

99. Hardie D. G., Carling D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246(2), 259-273.
100. Makinde A.O., Gamble J., Lopaschuk G.D. (1997). Upregulation of 5'-AMP-activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circulation Research*, 80(4), 482-489.
101. Ai H., Ihlemann J., Hellsten Y., Lauritzen H. P., Hardie D. G., Galbo H., Ploug T. (2002). Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulated glucose transport in rat muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(6), 1291-1300.
102. Lee E. S., Uhm K. O., Lee Y. M., Han M., Lee M., Park J. M., Suh P. G., Park S. H., Kim H. S. (2007). CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(4), 854-858.
103. Nie T., Zhu L., Yang Q. (2021). *The Classification and Basic Processes of Autophagy*. In: Xie Z, editor. *Autophagy: biology and diseases: technology and methodology*. Springer Singapore: Singapore, p. 3–16
104. Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.
105. Yamamoto Y. H., Noda T. (2020). Autophagosome formation in relation to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 97.
106. Hamasaki M., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Oomori H., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amano A., Yoshimori T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), 389-393.
107. Hayashi-Nishino M., Fujita N., Noda T., Yamaguchi A., Yoshimori T., Yamamoto A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1433-1437.
108. Soars M. G., Barton P., Ismail M., Jupp R., Riley R. J. (2012). The development, characterization, and application of an OATP1B1 inhibition assay in drug discovery. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(8), 1641-1648.
109. Chen J. B., Chern T. R., Wei T. T., Chen C. C., Lin J. H., Fang J. M. (2013). Design and synthesis of dual-action inhibitors targeting histone deacetylases and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase for cancer treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(9), 3645-3655.
110. Dansette P. M., Jaouen M., Pons C. (2000). HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 52(2), 145-148.
111. Zou H., Wu H., Zhang X., Zhao Y., Stöckigt J., Lou Y., Yu Y. (2010). Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationship study of novel cytotoxic aza-caffeic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(17), 6351-6359.

112. Xia C. N., Li H. B., Liu F., Hu W. X. (2008). Synthesis of trans-cafeate analogues and their bioactivities against HIV-1 integrase and cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(24), 6553-6557.
113. Chen H. Z., Chen Y. B., Lv Y. P., Zeng F., Zhang J., Zhou Y. L., Li H. B., Chen L. F., Zhou B. J., Gao J. R., Xia C. N. (2014). Synthesis and antitumor activity of feruloyl and caffeoyl derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(18), 4367-4371.
114. Erel Ö. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112-119
115. Işık A., Koca S. S. (2006). Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Behçet's Disease. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20 (6), 415-421.
116. Dordević G., Durić S., Apostolskit S., Dordević V., Zivković M. (2008). Total antioxidant blood capacity in patients with type 2 diabetes mellitus and distal symmetrical polyneuropathy, *Vojnosanitetski pregled*, 65(9), 663-669
117. Song F., Jia W., Yao Y., Hu Y., Lei L., Lin J., Sun X., Liu L. (2007). Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clinical Science*, 112, 599-606.
118. Erel Ö. (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
119. Altındağ Ö., Koçyiğit A., Çelik N., Çelik H., Soran N. (2007). DNA Damage and Oxidative Stress in Patients with Osteoarthritis: a Pilot Study. *Rheumatism*, 22, 60-63
120. Unger C., Lokmer N., Lehmann D., Axmann I. M. (2019). Detection of phenol contamination in RNA samples and its impact on qRT-PCR results. *Analytical Biochemistry*, 571, 49-52.
121. Shen C. (2019). Diagnostic Molecular Biology, Chapter 7 - Detection and Analysis of Nucleic Acids. United Kingdom, Oxford: Elsevier, 167-185.
122. Shan J., Ord D., Ord T., Kilberg M. S. (2009). Elevated ATF4 expression, in the absence of other signals, is sufficient for transcriptional induction via CCAAT enhancer-binding protein-activating transcription factor response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21241-21248.
123. Gade P., Kimball A. S., DiNardo A. C., Gangwal P., Ross D. D., Boswell H. S., Keay S. K., Kalvakolanu D. V. (2016). Death-associated Protein Kinase-1 Expression and Autophagy in Chronic Lymphocytic Leukemia Are Dependent on Activating Transcription Factor-6 and CCAAT/Enhancer-binding Protein-β. *Journal of Biological Chemistry*, 291(42), 22030-22042.
124. Xiao G., Huang W., Zhan Y., Li J., Tong W. (2020). CircRNA_103762 promotes multidrug resistance in NSCLC by targeting DNA damage inducible transcript 3 (CHOP). *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(6), 23252.

125. Tzanetakis A., Antounians L., Belfiore A., Ma Q., Stasiewicz M., Pellerito O., Zani A. (2019). Endoplasmic reticulum stress response is activated in pulmonary hypoplasia secondary to congenital diaphragmatic hernia, but is decreased by administration of amniotic fluid stem cells. *Pediatric Surgery International*, 35(1), 63-69.
126. Cao B., Shi Q., Wang W. (2015). Higher expression of SIRT1 induced resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Journal of Thoracic Disease*, 7(4):711-9.
127. Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H., Manz R. A., Miltenyi S., Radbruch A., Assenmacher M., Schmitz J. (1999). Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *European Journal of Immunology*, 29(12), 4053-4059.
128. Zeng H., Liu Z. (2019). Atorvastatin Induces Hepatotoxicity in Diabetic Rats via Oxidative Stress, Inflammation, and Anti-Apoptotic Pathway. *Medical Science Monitor*, 25, 6165-6173.
129. Pal S., Ghosh M., Ghosh S., Bhattacharyya S., Sil P. C. (2015). Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 36-47.
130. Betteridge D. J., Carmena R. (2016). The diabetogenic action of statins - mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 12, 99–110.
131. Sattar N., Preiss D., Murray H. M., Welsh P., Buckley B. M., de Craen A. J., Seshasai S. R., McMurray J. J., Freeman D. J., Jukema J. W., Macfarlane P. W., Packard C. J., Stott D. J., Westendorp R. G., Shepherd J., Davis B. R., Pressel S. L., Marchioli R., Marfisi R. M., Maggioni A. P., Tavazzi L., Tognoni G., Kjekshus J., Pedersen T. R., Cook T. J., Gotto A. M., Clearfield M. B., Downs J. R., Nakamura H., Ohashi Y., Mizuno K., Ray K. K., Ford I. (2010). Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*, 375(9716), 735-742.
132. Cederberg H., Stančáková A., Yaluri N., Modi S., Kuusisto J., Laakso M. (2015). Increased risk of diabetes with statin treatment is associated with impaired insulin sensitivity and insulin secretion: a 6 year follow-up study of the METSIM cohort. *Diabetologia*, 58(5), 1109-1117.
133. Urbano F., Bugliani M., Filippello A., Scamporrino A., Di Mauro S., Di Pino A., Scicali R., Noto D., Rabuazzo A. M., Averna M., Marchetti P., Purrello F., Piro S. (2017). Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat β -Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Scientific Report*, 7(1), 118630- 118634.
134. Ozyurt H., Ozyurt B., Koca K, Ozgocmen S. (2007). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascular Pharmacology*, 47(2-3), 108-112.
135. Xu J.W., Ikeda K., Kobayakawa A., Ikami T., Kayano Y., Mitani T., Yamori Y. (2005). Downregulation of Rac1 activation by caffeic acid in aortic smooth muscle cells. *Life Science*, 76(24), 2861-2872.

136. Libby P. 2000. Changing coNational Cholesterol Education Programts of atherogenesis. *Journal of International Medical Research* 247, 349–358.
137. Yang R. L., Shi Y. H., Hao G., Li W., Le G. W. (2008). Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(3), 154-158.
138. Klafke J. Z , da Silva M. A., Panigas T. F., Belli K. C., de Oliveira M. F., Barichello M. M., Rigo F. K., Rossato M. F., Soares dos Santos A. R , Pizzolatti M. G., Ferreira J., Viecili P. R. (2010). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 299-305.
139. Carnevale R., Pignatelli P., Di Santo S., Bartimoccia S., Sanguigni V., Napoleone L., Tanzilli G., Basili S., Violi F. (2010). Atorvastatin inhibits oxidative stress via adiponectin-mediated NADPH oxidase down-regulation in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, 213(1), 225-234.
140. Erboga M., Kanter M., Aktas C., Bozdemir D.Y., Fidanol E. Z., Aktas E., Gurel A. (2016). Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biological Trace Element Research*, 171(1), 176-184.
141. Aydin H. E., Ozkara E., Ozbek Z., Vural M., Burukoglu D., Arslantas A., Atasoy M..A. (Histopathological Evaluation of the Effects of CAPE in Experimental Spinal Cord Injury. (2016). *Turkish Neurosurgery*, 26(3), 437-444.
142. Eser N., Cicek M., Yoldas A., Demir M., Deresoy F. A. (2022). Caffeic acid phenethyl ester ameliorates imidacloprid-induced acute toxicity in the rat cerebral cortex. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 96, 103980.
143. Pal S., Ghosh M., Ghosh S., Bhattacharyya S., Sil P. C. (2015). Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 36-47.
144. Rubinstein A. D., Kimchi A. (2012). Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 125(22), 5259-5268.
145. Yang N., Dang S., Shi J., Wu F., Li M., Zhang X., Li Y., Jia X., Zhai S. (2017). Caffeic acid phenethyl ester attenuates liver fibrosis via inhibition of TGF- β 1/Smad3 pathway and induction of autophagy pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(1), 22-28.
146. Misirkic M., Janjetovic K., Vucicevic L., Tovilovic G., Ristic B., Vilimanovich U., Harhaji-Trajkovic L., Sumarac-Dumanovic M., Micic D., Bumbasirevic V., Trajkovic V. (2012). Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin. *Pharmacological Research*, 65(1), 111-119.
147. Dikic I., Elazar Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349-364.

148. Ghavami S., Yeganeh B., Stelmack G. L., Kashani H. H., Sharma P., Cunnington R., Rattan S., Bathe K., Klonisch T., Dixon I. M., Freed D. H., Halayko A. J. (2012). Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death and Disease*, 3(6), 330.
149. van den Bosch B. J., Gerards M., Sluiter W., Stegmann A. P., Jongen E. L., Hellebrekers D. M., Oegema R., Lambrichts E. H., Prokisch H., Danhauser K., Schoonderwoerd K., de Coo I. F., Smeets H. J. (2012). Defective NDUFA9 as a novel cause of neonatally fatal complex I disease. *Journal of Medical Genetics*, 49(1), 10-15.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞEN Serkan

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

e-mail

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	Devam ediyor
Yüksek lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya	2010
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi / Biyoloji	2008
Lise	Antalya Gazi Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-Halen	Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniv.	Öğretim Görevlisi
2010-2018	Afyon Kocatepe Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Şen S, Çelik S. The effect of acetylsalicylic acid on vasopressin, serum insulin levels, insulin resistance, and biochemical parameters in rats induced with experimental diabetes type 2. Turk J Med Sci. 2017 Jun 12;47(3):996-1001.

Halici B, Sarinc Ulasli S, Günay E, Nural S, **Sen S**, Akar O, Celik S, Unlu M. Assessment of inflammatory biomarkers and oxidative stress in pulmonary thromboembolism: follow-up results. *Inflammation*. 2014 Aug;37(4):1186-90.

Çelik S, Baysal B, **Sen S**. Resveratrol Attenuates Benzo(a)pyrene-Induced Dysfunctions, Oxidative Stress and Apoptosis in Pancreatic Beta-Cells. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2019, 10, 389–404

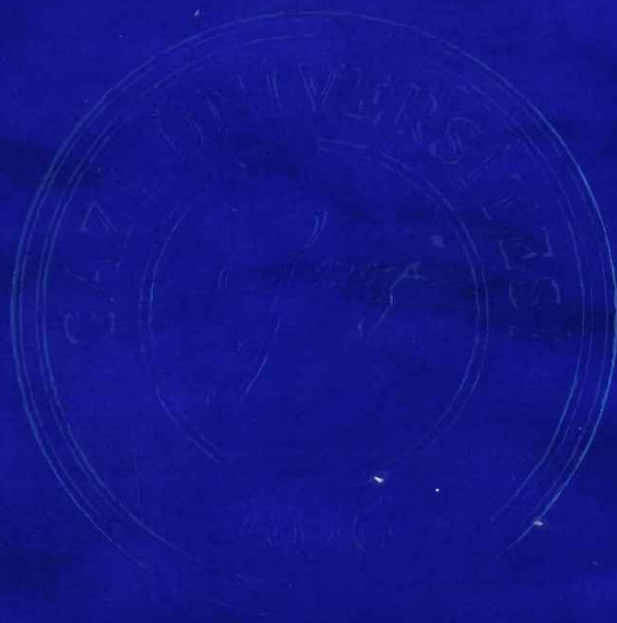
Çelik, S, **Sen S**, Hazman Ö. (2015). Endoplasmik retikulum stresine cevap yolları ve tip 2 diyabet patogeneğinde endoplasmik retikulum stres aracılı beta hücre apoptosisinin rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16(3), 227-237.

Şen M, **Sen S**, Altındış M, Çelik S, Altunbaş K, Ciğerci İ. H. Potential Contribution to Antidiabetic Treatments of Epstein-Barr Virus Proteins LMP1 and EBNA1. *Biotech and Strategic Health Res.* 2018; 2(3): 146-155.

|



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



Gavilâ olmahtıymalikin

